

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



TESIS DOCTORAL

**Pronóstico del carcinoma de cérvix en relación a
su perfil molecular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Rosa María García Martín

DIRECTORES

Claudio Ballestín Carcavilla
José Fermín Pérez-Regadera Gómez

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica

**PRONOSTICO DEL CARCINOMA DE CERVIX EN RELACION A SU PERFIL
MOLECULAR**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

Rosa María García Martín

Directores:

Dr. Claudio Ballestín Carcavilla

Dr. José Fermín Pérez-Regadera Gómez

Madrid, 2017

A mi “gran” familia

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha supuesto un largo proceso donde han intervenido muchas personas, unos han aportado su trabajo y sus conocimientos, otros su supervisión y todos ellos su apoyo.

El Dr. Jose Pérez Regadera, que aunque es uno de mis directores de tesis, puedo decir que es más un amigo que un director. Trabajando con él he aprendido muchas cosas del mundo de la clínica, y he podido comprobar el exquisito trato humano que tiene con sus pacientes. Gracias por tu ayuda en este proyecto, y por enriquecerme profesional y personalmente.

El Dr. Claudio Ballestín, también es mi director de tesis, y es también un gran amigo. Juntos hemos compartido mucho más que trabajo y laboratorio, son muchos buenos y malos momentos profesionales y personales. De él he aprendido prácticamente todo lo que sé de Inmunohistoquímica, de proteínas y de marcadores, y siempre me ha apoyado en mis decisiones. Gracias por todas las vivencias compartidas y por estar siempre disponible.

Otra persona a la que quiero mostrar mi gratitud es al Dr. José Luís Rodríguez Peralto, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre de Madrid, al que le agradezco poder contar siempre con su cariño, su ayuda y su buen humor, haciendo que la vida de todos los que estamos a su alrededor sea más fácil. Gracias por tu amabilidad y disposición.

También quiero mencionar a la Dra. Erica Riveiro, a la que tengo que agradecer su orientación, su inestimable ayuda, y su total disposición a colaborar.

Gracias a David Lora, por su gran ayuda con la estadística.

Gracias A mis “chicas” del laboratorio, Ángela, Cari, Pilar y Juana, que han sabido sobrellevar mi estado de ánimo, y me han apoyado siempre en mi empeño.

Gracias a Elidia por hacer siempre todo lo posible para que las cosas me salieran bien.

Y como soy consciente de que nadie hace nada solo, agradezco a todo el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre de Madrid, desde los celadores, auxiliares técnicos, enfermeras, administrativos, becarios, biólogos y patólogos, por todo el apoyo que he recibido de todos y cada uno de ellos.

A mis padres les agradezco el apoyo incondicional que he tenido siempre por su parte y todo su cariño. A mis hermanos y su pandilla les agradezco su tiempo, su ayuda, su apoyo y sobre todo, el estar siempre ahí cuando les necesito.

A Josemi y a Daniel por su paciencia, ayuda y apoyo, por compartir conmigo la vida en sus mejores y en sus peores momentos. Sin vosotros no hubiera llegado nunca a conseguirlo.

Pronostico del carcinoma de cérvix en relación a su perfil molecular

Introducción:

La distinta evolución de las pacientes con carcinoma de cérvix avanzado avoca a buscar nuevos marcadores moleculares, que pudieran manifestar alguna diferencia significativa, que permitiera personalizar los tratamientos para conseguir una mejora en la evolución de la enfermedad.

En este estudio se evaluó además de los factores pronósticos clínicos, el factor de proliferación, medido por la expresión de Ki67, la angiogénesis con el marcaje de microvasos por CD34, y los factores reguladores del ciclo celular p53 y p21^{waf}.

Material y Métodos:

El estudio comprende 186 pacientes con carcinoma de cérvix avanzado tratadas solo con radioterapia y quimioterapia concomitante.

Los factores clínicos seleccionados para este estudio fueron: el estado general del paciente (ECOG), el estadio FIGO, el tipo de tumor, el tamaño tumoral y la afectación ganglionar.

Se realizaron los estudios de hematoxilina-eosina y técnicas inmunohistoquímicas para la expresión de las proteínas Ki67, CD34, p53 y p21^{waf}.

Se elaboraron los estudios estadísticos para relacionar cada una de los factores, tanto clínicos como moleculares, con la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia libre de fracaso local, y también para analizar la relación entre las proteínas estudiadas.

Resultados:

Se observa una relación significativa tanto con la supervivencia global, la progresión y el fracaso local con los factores clínicos clásicos. De las proteínas estudiadas solo tuvo una relación significativa con todos los tipos de supervivencia estudiados la expresión de Ki67.

Los valores menores del 40% de la expresión de la proteína Ki67 se relacionan significativamente con un peor pronóstico en las pacientes tratadas sólo con radioterapia y quimioterapia concomitante.

Se encontró relación significativa entre las proteínas p53 y p21waf. Aunque no se encontró relación con la supervivencia.

Cuando los valores de p21waf y p53 eran bajos se encontró relación con un valor de proliferación alto.

Conclusión:

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la literatura, los factores pronósticos clínicos estudiados están directamente relacionados con la supervivencia.

La proteína Ki67 resultó ser un factor pronóstico tanto para la supervivencia global, la progresión y el fracaso local.

Valores bajos de proliferación fueron indicadores de mal pronóstico en la supervivencia para las pacientes tratadas con radioterapia.

Se encontró una relación de dependencia entre las proteínas p53 y p21waf.

Prognosis of cervix carcinoma according to its molecular profile

Patients with advanced cervical carcinoma present differences in their prognosis during the evolution of the disease. The identification of new molecular marker in advanced cervical carcinoma could contribute not only for diagnostic and prognostic purposes but also for the detection of potential therapeutic targets in advanced cervical carcinomas. In this study, different clinical prognostic factors and molecular markers, including the proliferative marker Ki67, microvessels labeled by CD34 and the cell cycle regulatory factors p53 and p21waf were evaluated in a series of advanced cervical carcinoma specimens.

Material and methods:

In total, 186 patients with advanced cervical carcinoma were included in this study. Hematoxylin-eosin stain and immunohistochemical techniques for the detection of Ki67, CD34, p53 and p21waf expression were performed in all the cases. Statistical studies were performed to correlate each of the clinical factors and molecular markers to the overall survival, progression-free survival and local failure-free survival. Analyses for the correlation between the different molecular markers were also performed.

Results:

In this study, distinct clinical factors, including general patient status (ECOG), FIGO stage, tumor size and nodal involvement, correlated to overall survival, progression-free survival and local failure-free survival in patients with advanced cervical carcinoma. Regarding the molecular markers studied, only the expression of Ki67 presented a significant influence in patient survival. It was also detected a significant correlation between p53 and p21waf expression in advanced cervical carcinoma.

Conclusion:

This study confirms that clinical prognostic factors already described in the literature correlated to survival of patients with advanced cervical carcinoma.

Low Ki67 expression proved to be an indicator of poor prognosis in patients with advanced cervical carcinoma treated with radiotherapy. There was a significant correlation between p53 and p21waf expression in advanced cervical carcinoma.

INDICE:

INTRODUCCIÓN

1.-EPIDEMIOLOGIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CANCER DE CERVIX.

- Prevalencia, incidencia y mortalidad -----1
- Factores etiológicos -----7

2.- HISTORIA NATURAL DEL CANCER DE CERVIX

- Fisiología de cérvix uterino -----10
- Lesiones precursoras y carcinoma de cérvix -----10
- Clasificación histopatológica de los tumores de cérvix -----13
 - Tumores epiteliales -----15
 - Tumores glandulares -----19
 - Otros tumores-----22

3.-CLINICA Y DIAGNOSTICO DEL CARCINOMA DE CERVIX

- Síntomas del carcinoma de cérvix -----24
- Diagnostico -----25
- Tratamiento -----26

4.-ESTUDIO DE EXTENSION Y ESTADIAJE

- Estadificación clínica -----28
- Estadiaje quirúrgico de la diseminación regional -----31

5.-BIOLOGIA MOLECULAR DEL CARCINOMA DE CERVIX

• Ciclo celular -----	32
➤ Fases del ciclo celular -----	32
➤ Regulación del ciclo celular -----	34
▪ Señales activadoras e inhibidoras del ciclo celular-----	34
• Desregulación del ciclo celular por el virus HPV.-----	39
• Angiogénesis. -----	42
• Proteína P53 -----	43
• Proteína p21 ^{waf/cip} -----	45
• Proliferación: Ki67 -----	46

6.-FACTORES PRONOSTICOS

• Relacionados con la clínica.-----	48
• Relacionados con el tumor-----	50

OBJETIVOS-----53

MATERIAL Y METODOS

1.-SELECCION DE CASOS -----	54
2.-DATOS CLINICOS-----	54
3.-ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO-----	55
4.-ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO-----	56
5.-EVALUACION DE LA TINCION INMUNIHISTOQUIMICA-----	57
6.-ANALISIS DE DATOS-----	58

RESULTADOS

1.-ANALISIS DESCRIPTIVO-----	60
2.-SUPERVIVENCIA GLOBAL-----	76
3.-SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESION-----	85
4.-SUPERVIVENCIA LIBRE DE FRACASO LOCAL -----	94
5.-RELACION ENTRE LAS PROTEINAS Y LOS FACTORES CLINICOS-----	104

<u>DISCUSION</u> -----	119
-------------------------------	-----

<u>CONCLUSIONES</u> -----	134
----------------------------------	-----

<u>BLBLIOGRAFIA</u> -----	135
----------------------------------	-----

FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix en el mundo.

Figura 2. Estimación de la mortalidad por cáncer cervical en el mundo.

Figura 3. Incidencia de cáncer de cuello uterino en comparación con otros tipos de cáncer en las mujeres de todas las edades en España.

Figura 4. Número anual de casos y las tasas de incidencia específicas por edad de cáncer de cuello uterino en España.

Figura 5. Tasas de incidencia específicas por edad de cáncer cervical en España en comparación con el sur de Europa y con el mundo.

Figura 6: Evolución de la incidencia por cáncer de cérvix en España en comparación con otros países europeos.

Figura 7: Mortalidad por ca. cervical en comparación con muerte por otros tumores en España.

Figura 8.- Lesiones preinvasivas del cérvix.

Figura 9. Carcinoma epidermoide infiltrante de cérvix de tipo queratinizante de célula grande.

Figura 10. Carcinoma epidermoide infiltrante de cérvix de tipo no queratinizante de célula grande

Figura 11. Carcinoma epidermoide infiltrante de cérvix de tipo no queratinizante de célula pequeña.

Figura 12. Carcinoma verrucoso de cérvix (patrón de crecimiento expansivo).

Figura 13. Adenocarcinoma de cérvix de tipo endocervical.

Figura 14. Adenocarcinoma villoglandular de cérvix.

Figura 15. Adenocarcinoma endometriode de cérvix.

Figura 16. Adenocarcinoma de células claras de cérvix.

Figura 17. Carcinoma adenoescamoso de cérvix.

Figura 18.- Representación de la activación de p53 por daño en el DNA.

Figura 19.- Fosforilación de la proteína del retinoblastoma.

Figura 20.- Detención del ciclo celular.

Figura 21.- Ciclo celular e interacciones de las proteínas E6 y E7 del HPV.

Figura 28.- Distribución de las pacientes por edades.

Figura 29.- Distribución de las pacientes por el grado de ECOG.

Figura 30.-Distribución de las pacientes por el grado de ECOG agrupado.

Figura 31.-Distribución de la población por el estadio FIGO.

Figura 32.-Distribución de la población por el estadio FIGO agrupado.

Figura 33.-Distribución de las pacientes por la afectación ganglionar.

Figura 34.-Distribución de la población por la afectación ganglionar agrupada

Figura 35.-Distribución de la población por el tipo tumoral.

Figura 36.- Distribución de la población por el tamaño tumoral.

Figura 37.- Distribución de las pacientes por la indicación de cirugía.

Figura 38.- Distribución de las pacientes por pruebas realizadas para el diagnóstico.

Figura 39.- Distribución de las pacientes por la braquiterapia aplicada.

Figura 40.- Distribución de las pacientes por la prescripción aplicada.

Figura 41.-Distribución de las pacientes por la prescripción aplicada.

Figura 42.-Porcentaje de la población y sus valores de expresión de p53.

Figura 43.- Porcentaje de pacientes y valores de expresión de p21waf.

Figura 44.- Porcentaje de pacientes y valores de expresión de Ki67.

Figura 45.- Porcentaje de pacientes y valores de expresión de CD34.

Figura 46.- Función de supervivencia global a los 5 años de los dos grupos de pacientes con valores de ECOG 1-2 y 3-4.

Figura 47.- Función de supervivencia global a los 5 años de las pacientes distribuidas por los valores de FIGO.

Figura 48.-Función de supervivencia global a los 5 años dependiendo del tamaño tumoral.

Figura 49.-Función de supervivencia global a los 5 años dependiendo de la afectación ganglionar.

Figura 50.-Función de supervivencia global a los 5 años dependiendo de la expresión de Ki67.

Figura 51.- Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años de los dos grupos de pacientes con valores de ECOG 1-2 y 3-4.

Figura 52.- Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años de las pacientes distribuidas por los valores de FIGO.

Figura 53.-Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años dependiendo del tamaño tumoral.

Figura 54.-Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años dependiendo de la afectación ganglionar.

Figura 55. -Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años dependiendo de la expresión de Ki67.-Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años dependiendo de la expresión de Ki67.

Figura 56.- Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años de los dos grupos de pacientes con valores de ECOG 1-2 y 3-4.

Figura 57.- Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años de las pacientes distribuidas por los valores de FIGO.

Figura 58.-Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años dependiendo del tamaño tumoral.

Figura 59.-Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años dependiendo de la afectación ganglionar.

Figura 60.-Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años dependiendo de la expresión de Ki67.

Figura 61.-Expresión de la proteína CD34 (20X).

Figura 62.-Alta y baja expresión de la proteína ki67 (20X).

Figura 63.-Alta y baja expresión de la proteína p21waf (20X).

Figura 63.-Alta y baja expresión de la proteína p53 (20X).

TABLAS

Tabla 1.-Clasificación de lesiones preinvasivas de cérvix.

Tabla 2.- Clasificación de los tumores cervicales.

Tabla3.-Estatificación de cáncer de cuello uterino de acuerdo a los criterios unificados de la AJCC y FIGO.

Tabla 4.-Estadificación de cáncer de cuello uterino de acuerdo a los criterios unificados de la AJCC y FIGO. Nódulos Linfáticos Regionales(N).

Tabla 5.-Estatificación de cáncer de cuello uterino de acuerdo a los criterios unificados de la AJCC y FIGO. Metástasis a distancia (M).

Tabla 6.-Agrupación por estadios de FIGO/TNM (2010).

Tabla 7.- Quinasas y ciclinas activas en cada fase del ciclo celular.

Tabla 8.- Representación de la escala ECOG.

Tabla 8b.-Características de los anticuerpos utilizados.

Tabla 9.-Análisis descriptivo de las pacientes.

Tabla 10.- Distribución de las pacientes por la edad.

Tabla 11.-Distribución de las pacientes por el grado de ECOG.

Tabla 12.-Distribución de las pacientes por el grado de ECOG agrupado.

Tabla 13.-Distribución de las pacientes por el estadio FIGO.

Tabla 14.- Distribución de las pacientes por el estadio FIGO agrupado.

Tabla 15.-Distribución de las pacientes por la afectación ganglionar.

Tabla 16.- Distribución de las pacientes por la afectación ganglionar agrupada.

Tabla 17.- Distribución de las pacientes por el tipo tumoral.

Tabla 18.-Distribución de las pacientes por el tamaño tumoral.

Tabla 19.-Distribución de las pacientes por la indicación de cirugía para el diagnóstico.

Tabla 20.-Distribución de las pacientes por la indicación de cirugía para el diagnóstico.

Tabla 21.-Distribución de las pacientes por la braquiterapia aplicada.

Tabla 22.-Distribución de las pacientes por la prescripción aplicada.

Tabla 23.-Distribución de las pacientes por la prescripción aplicada.

Tabla 24.-Expresión de las proteínas estudiadas

Tabla 25.- Representación de las probabilidades de supervivencia global a los 5 años junto con su intervalo de confianza del 95% y el valor de p según la estimación de Kaplan-Meier

Tabla 26.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de ECOG.

Tabla 27.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de FIGO.

Tabla 28.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tamaño tumoral.

Tabla 29.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tipo histológico.

Tabla 30.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la afectación ganglionar.

Tabla 31.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de Ki67.

Tabla 32.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p53.

Tabla 33.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p21waf.

Tabla 34.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de CD34.

Tabla 35.-Representación de las probabilidades de supervivencia libre de progresión a los 5 años junto con su intervalo de confianza del 95% y el valor de p según la estimación de Kaplan-Meier

Tabla 36.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de ECOG.

Tabla 37.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de FIGO.

Tabla 38.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tamaño tumoral.

Tabla 39.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tipo histológico.

Tabla 40.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes con o sin afectación ganglionar.

Tabla 41.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de Ki67.

Tabla 42.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p53.

Tabla 43.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p21waf.

Tabla 44.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de CD34.

Tabla 45.- Representación de las probabilidades de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años junto con su intervalo de confianza del 95% y el valor de p según la estimación de Kaplan-Meier

Tabla 46.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de ECOG.

Tabla 47.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de FIGO.

Tabla 48.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tamaño tumoral.

Tabla 49.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tipo histológico.

Tabla 50.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes con o sin afectación ganglionar.

Tabla 51.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de Ki67.

Tabla 52.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p53.

Tabla 53.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p21waf.

Tabla 54.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de CD34.

Tabla 55.-Expresión de p53 en relación con las variables clínicas.

Tabla 56.- Expresión de la proteína p53 y el estado del paciente

Tabla 57.- Expresión de la proteína p53 en los diferentes grupos de estadio FIGO.

Tabla 58.- Expresión de la proteína p53 y el tamaño tumoral.

Tabla 59.- Expresión de la proteína p53 y el tipo histológico.

Tabla 60.- Expresión de la proteína p53 y la afectación ganglionar

Tabla 61.- Expresión de la proteína p21waf en relación con los factores clínicos

Tabla 62.- Expresión de la proteína p21waf y el estado del paciente

Tabla 63.- Expresión de la proteína p21waf y los estadios FIGO.

Tabla 64.- Expresión de la proteína p21waf y el tamaño tumoral.

Tabla 65.- Expresión de la proteína p21waf y el tipo histológico.

Tabla 66.- Expresión de la proteína CD34 en relación con los factores clínicos

Tabla 67.- Expresión de la proteína CD34 y el estado del paciente

Tabla 68.- Expresión de la proteína CD34 y los estadios FIGO.

Tabla 69.- Expresión de la proteína CD34 y el tamaño tumoral.

Tabla 70.- Expresión de la proteína CD34 y el tipo histológico.

Tabla 71.- Expresión de la proteína p53 y la afectación ganglionar.

Tabla 72.- Supervivencia global estimada a los 3 y 5 años para la asociación p53 y p21waf

Tabla 73.- Porcentaje de pacientes con los diferentes valores de Ki67 en relación a los diferentes valores de p53 / p21waf.

1.-EPIDEMIOLOGIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CANCER DE CERVIX

Prevalencia, Incidencia y Mortalidad

La prevalencia es la proporción de individuos que presentan cáncer de cérvix en una población concreta en un momento dado.

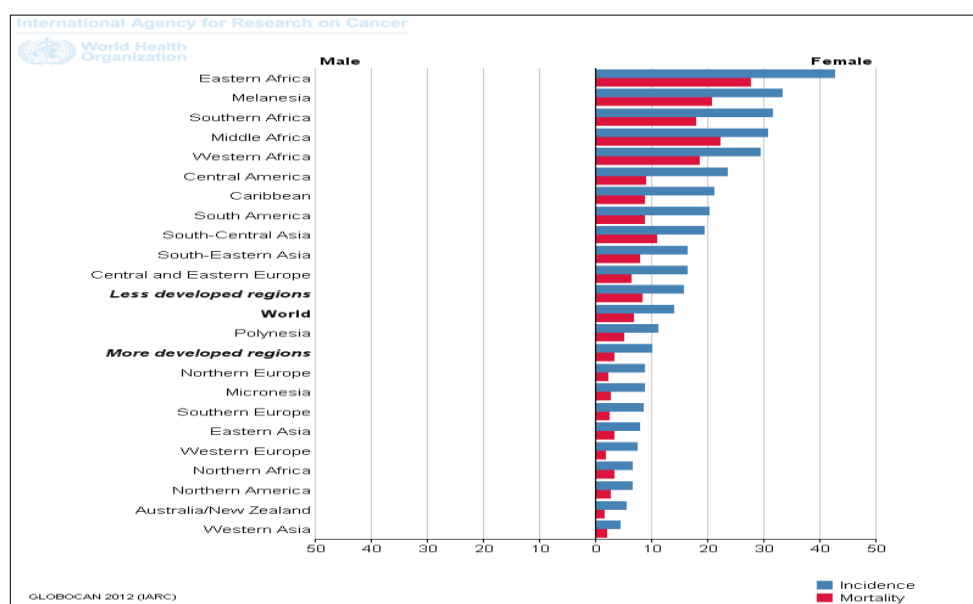
La incidencia es la frecuencia de aparición de nuevos casos de cáncer de cérvix en un periodo determinado (generalmente un año) en una población concreta.

El cáncer de cérvix es uno de los tumores malignos con mayor incidencia en la mujer y que causa miles de muertes cada año principalmente en los países subdesarrollados.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012, hubo 527,624 casos de ca. de cérvix en el mundo. Fue la cuarta causa de mortalidad en mujeres, más de 265.000 murieron en el mundo a causa de este tumor, una gran mayoría en países poco desarrollados. A nivel mundial, el Ca. de cérvix ocuparía el tercer lugar en incidencia en mujeres¹ y el séptimo si se contabiliza el total de la población.

Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix en el mundo.

Tomada de Globocan 2012. IARC



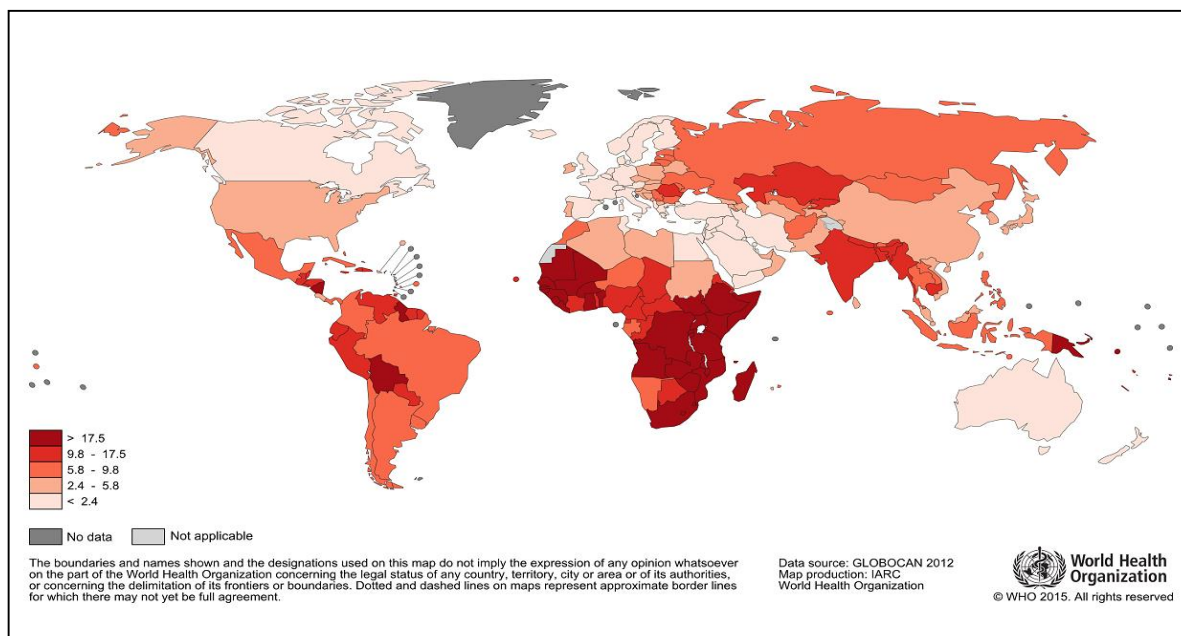
Si tomamos como referencia la media mundial todos los países por encima de la media son países pobres o poco desarrollados donde tanto la incidencia del cáncer de cérvix como la mortalidad son mayores.

A diferencia del Ca. de mama que mantiene su estatus de primer puesto en todos los estudios realizados, el ca. de cérvix experimenta grandes diferencias entre los países más y menos desarrollados.

Mientras que en América Latina, África o Asia, el ca. de cérvix ocupa el segundo lugar en incidencia después del Ca. de mama, y presentan una mortalidad del 9.9%, 19.9% y 8 % respectivamente, las cifras disminuyen drásticamente si comparamos estos datos con otros continentes más desarrollados. En EEUU, ocupa el onceavo lugar en incidencia y su mortalidad supone el 2.2%. En Europa ocupa el quinto puesto en incidencia y la mortalidad es del 3.3%.

Figura 2. Estimación de la mortalidad por cáncer cervical en el mundo.

Tomada de Globocan 2012. IARC



Las diferencias entre los países más desarrollados y menos son tantas que incluso, comparando los datos entre Europa y la Unión Europea (28 países), las diferencias son considerables. Mientras que en Europa la incidencia del Ca. de cérvix ocupa el quinto puesto, en la Unión Europea desciende hasta el sexto, y en mortalidad supone el sexto puesto con un 3.3% en Europa, frente al noveno puesto con un 2.3% en la Unión Europea.

Según la OMS, la incidencia en España es similar a la de Europa, el Ca. de cérvix ocupa el quinto puesto y supone el 2.2% de las muertes en mujeres. Sin embargo, un reciente y exhaustivo estudio, realizado por el Centro de Información de HPV y Cáncer en Europa y publicado en el 2014, arroja nuevos datos sobre la incidencia del cáncer de cérvix en España².

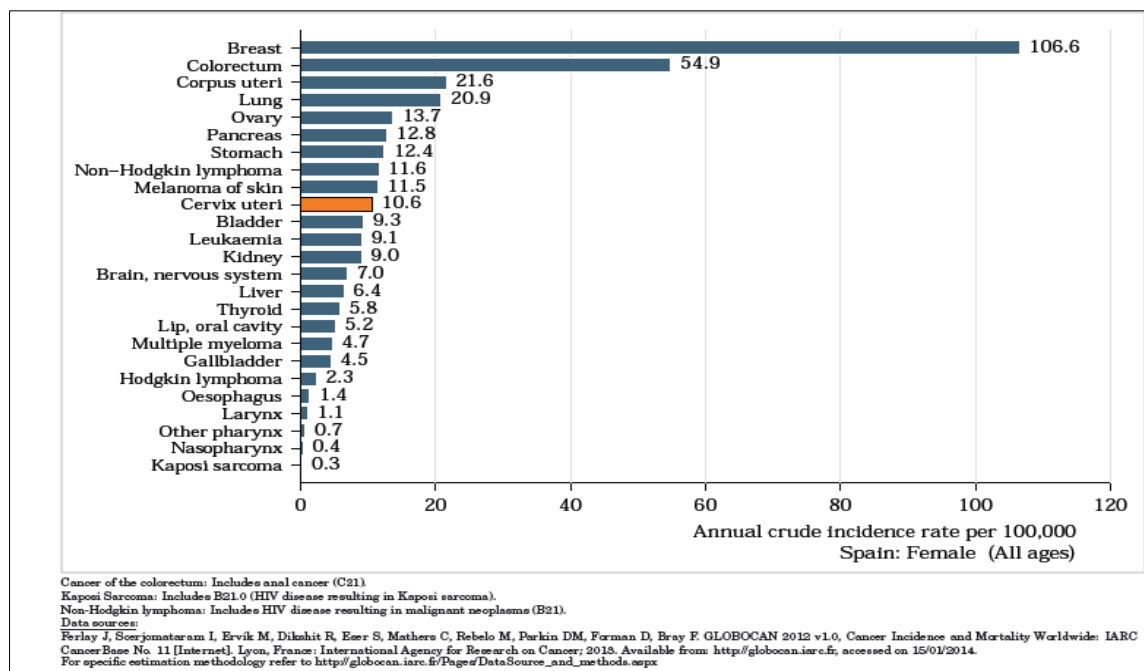


Figura 3. Incidencia de cáncer de cuello uterino en comparación con otros tipos de cáncer en mujeres en España.

Tomada de Globocan 2012. IARC

España tiene una población de 20.24 millones de mujeres mayores de 15 años (año 2014). Se estima que cada año 2511 mujeres son diagnosticadas de cáncer cervical, y 848 mueren por esta causa.

Figura 4. Número anual de casos y las tasas de incidencia específicas por edad de cáncer de cuello uterino en España.

Tomada de Globocam 2012. IARC

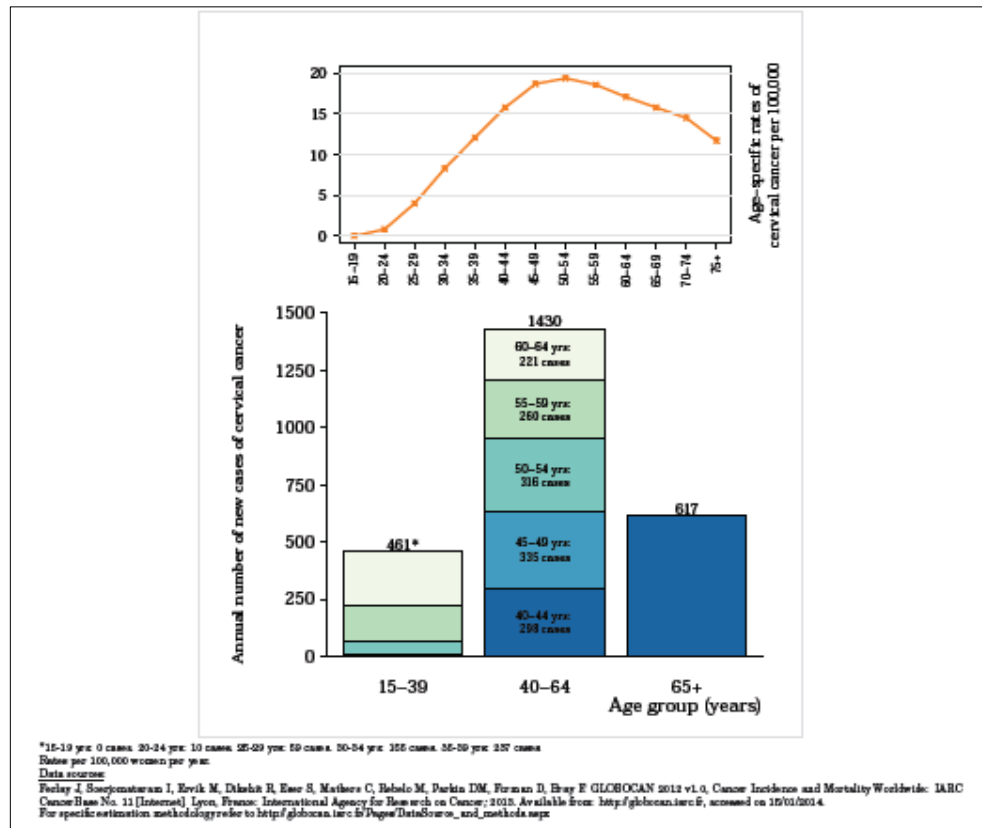
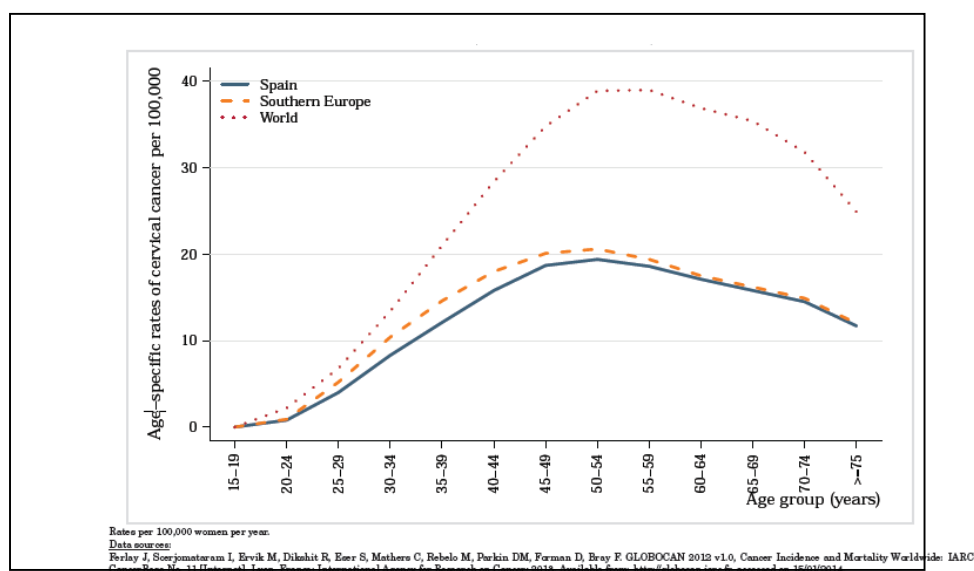


Figura 5. Tasas de incidencia específicas por edad de cáncer cervical en España en comparación con el sur de Europa y con el mundo.

Tomada de Globocam 2012. IARC

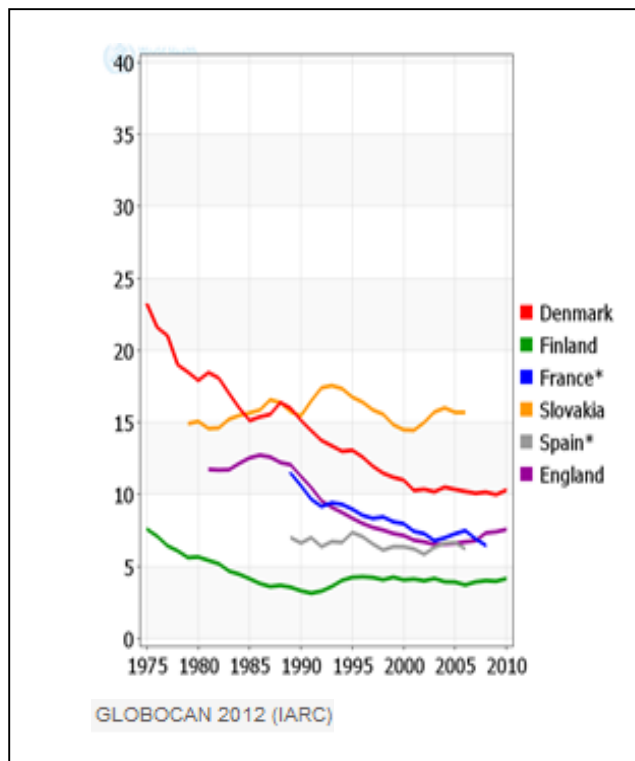


Según este estudio el cáncer cervical ocuparía el décimo lugar entre los carcinomas más frecuentes en mujeres en España, pero pasaría al segundo puesto si solo consideramos la población femenina entre 15 y 44 años.

Tanto la incidencia, como los grupos de edad en España se mantienen muy similares a los del Sur de Europa, sin embargo a nivel mundial, la incidencia es mucho mayor y los grupos de edad algo más dispersos, aunque la máxima incidencia se observa entre los 50 y los 60 años.

Figura 6: Evolución de la incidencia por cáncer de cérvix en España en comparación con otros países europeos.

Tomada de Globocan 2012. IARC

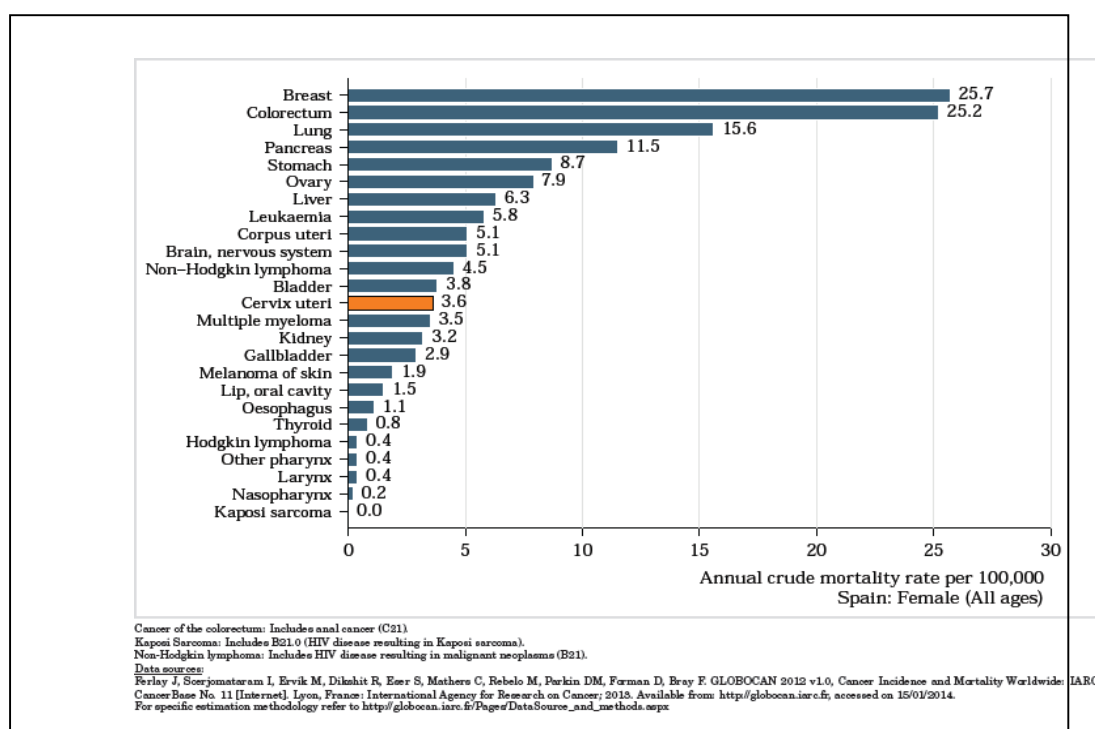


En la mayoría de los países europeos la mortalidad por carcinoma de cérvix sufrió un fuerte descenso en las últimas décadas del siglo XX. Esto pudo ser debido gracias a la gran expansión de los sistemas de cribaje en la población femenina. La citología vaginal, un método fácil, rápido y barato permite un diagnóstico precoz de las alteraciones del cérvix.

Sin embargo, en los últimos años la tasa de mortalidad se mantiene, por lo que cabría pensar que tanto el tratamiento como el cribado están siendo correctos, pero por diversas circunstancias aún queda un sector de la población que no tiene acceso, o no participa de las revisiones preventivas, lo que conlleva que cuando se detecta un tumor en estos casos, suele encontrarse en un estadio muy avanzado.

Figura 7: Mortalidad por ca. cervical en comparación con muerte por otros tumores en España.

Tomada de Globocam 2012. IARC



En los últimos años se ha estudiado la altísima relación entre la infección por el Virus del Papiloma Humano (HPV) y el Carcinoma de Cérvix. En este sentido, también ha sido importante el diagnóstico precoz realizado por la citología vaginal.

Factores Etiológicos

Diferentes estudios epidemiológicos han podido identificar un grupo de factores que podrían estar implicados en la histogénesis de las lesiones precursoras y su evolución a carcinoma de cérvix:

- Edad

El carcinoma de cérvix es un tumor característico de mujeres en edad fértil, con un pico de incidencia entre los 30 y los 50 años (AECC 2013) lo que sugiere la infección a temprana edad y una progresión lenta a cáncer.

- Multiparidad

Una alta paridad ha sido encontrada en muchos trabajos asociada al carcinoma de cérvix y al carcinoma in situ³.

Según la agencia internacional para el cáncer (IARC) la incidencia de cáncer de cérvix en mujeres, con siete o más embarazos a término, fue cuatro veces mayor que en las mujeres nulíparas, y el riesgo aumentó linealmente con el aumento del número de embarazos.

Entre otras razones se podría apuntar a que el aumento de los niveles de estrógeno y progesterona inducidos por el embarazo podrían modular la respuesta inmune al HPV e influir en el riesgo de persistencia o progresión de la infección.

- Relaciones Sexuales

La asociación entre las relaciones sexuales y el carcinoma de cérvix ha sido estudiada desde antiguo por su evidencia.

El comienzo de las relaciones sexuales a edad muy temprana, así como un elevado número de parejas sexuales, elevan la incidencia de ca. de cérvix.

Principalmente por el mayor riesgo de la transmisión de HPV y otros agentes potencialmente carcinogénicos.

El riesgo de lesión intraepitelial cuando el primer coito se tiene antes de los 17 años es 2.4 veces mayor que cuando este se tiene a los 21 años⁵. Tan importante como el elevado número de parejas sexuales en la mujer, o el comienzo precoz de sus relaciones sexuales, es la historia sexual de su compañero.⁶ En un estudio realizado con las parejas de mujeres con carcinoma de cérvix y otro grupo control con las parejas de mujeres sanas se encontró que los compañeros de las mujeres que integraban el grupo de mujeres con cáncer habían tenido mayor número de parejas que los compañeros de las mujeres control; de la misma forma se halló que habían tenido la primera relación sexual a edad más precoz y mostraban una historia mayor de infecciones de transmisión sexual. Otras características que

presentaban con mayor frecuencia eran las relaciones con prostitutas, el hábito de fumar y el poco uso de preservativos⁷.

- Tabaco

Las mujeres fumadoras presentan un mayor riesgo a padecer ca. de cérvix que aquellas que no fuman. Diferentes estudios demuestran que los carcinógenos del tabaco tienen especial preferencia por las células de estirpe escamosa⁸.

Se ha demostrado que en el moco cervical de las mujeres fumadoras la concentración de nicotina es mayor que la obtenida en el suero^{9,10,11}.

- Anticonceptivos hormonales

El uso continuado de anticonceptivos hormonales ha sido asociado a una mayor incidencia de displasias cervicales¹².

- Infección por HPV:

Es actualmente la enfermedad de transmisión sexual más frecuente para ambos sexos.

La infección por HPV produce unas lesiones premalignas que en muchos casos evolucionan a carcinoma. Las técnicas de cribado y un intenso seguimiento de las pacientes permiten el control de esta infección.

Este virus pertenece a la familia Papovaviridae, y se han identificado más de 150 subtipos diferentes, con diferente potencial oncogénico:

- Tipos de alto riesgo : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
- Tipos de bajo riesgo: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81¹³.

Los genotipos 16 y 18 son los de mayor riesgo, aumentando considerablemente la evolución a carcinoma de cérvix en las mujeres portadoras.

Podemos encontrar ADN del VPH en más del 95% de las lesiones premalignas (CIN) y en el 99% de los tumores de cérvix.

Sin embargo, también existen infecciones por serotipos de bajo riesgo de HPV en mujeres que nunca desarrollarán un carcinoma de cérvix. Por tanto, la infección viral no es suficiente para el desarrollo del cáncer de cérvix y pueden existir otros cofactores (anticonceptivos orales, tabaquismo,

deficiente higiene sexual, situaciones de inmunodeficiencia...) que actúan sinérgicamente y modulan la infección viral.

2.-HISTORIA NATURAL DEL CANCER DE CERVIX

FISIOLOGIA DEL CERVIX UTERINO

El Carcinoma de células escamosas de cuello uterino se desarrolla generalmente en la unión entre el epitelio columnar del canal endocervical y el epitelio escamoso del exocervix, en la denominada zona de transformación o unión escamocolumnar¹⁵. La imagen de esta zona varía a lo largo de la vida de la mujer. Es aquí donde se producen las lesiones intraepiteliales que podrían evolucionar a carcinoma invasor.

LESIONES PRECURSORAS Y CARCINOMA DE CERVIX

La carcinogénesis es un proceso complejo que se entiende como una secuencia de múltiples factores.

En una pequeña parte de los carcinomas de cérvix no podemos identificar lesiones precursoras pero la gran mayoría tiene como precursora a la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) de alto grado, que por un proceso de múltiples etapas pueden progresar a carcinoma de cérvix.

La clasificación anatomopatológica de las neoplasias cervicales se establece en base a las características celulares de las lesiones. En función de las mismas podemos diferenciar tumores invasivos, microinvasivos o lesiones intraepiteliales.

La realidad es que a veces es difícil discernir entre los diferentes grados de displasia, y entre displasia severa y carcinoma in situ, por lo que se propuso el termino CIN (neoplasia cervical intraepitelial) para referirse a un espectro de lesiones que van desde la displasia leve hasta el Carcinoma in situ.

- CIN I (displasia leve): las alteraciones sólo afectan al tercio inferior del grosor epitelial.
- CIN II (displasia moderada): las alteraciones epiteliales afectan a más del tercio inferior sin sobrepasar los dos tercios del espesor.

- CIN III (displasia severa más CIS): las alteraciones alcanzan la totalidad del grosor epitelial.

Con el fin de diagnosticar las distintas lesiones preinvasivas y unificar los diferentes criterios existentes, en 1988 se desarrolla el Sistema de Bethesda de acuerdo con el consenso del National Cancer Institute (NCI) y este se perfecciona en 1991¹⁶. Este sistema se detalla en el siguiente esquema, para muestras citológicas:

Tabla 1.-Clasificación de lesiones preinvasivas de cérvix.

	Antigua Clasificación	Nueva Clasificación
Displasia Leve	CIN I	SIL de bajo grado (LSIL)
Displasia	CIN II	SIL de alto grado (HSIL)
Displasia Severa	CIN III	SIL de alto grado (HSIL)
Carcinoma in situ	CIN III	SIL de alto grado (HSIL)

CIN: Neoplasia cervical intraepitelial. **SIL:** Lesión escamosa intraepitelial. **LSIL:** Neoplasia cervical intraepitelial de bajo grado. **HSIL:** Neoplasia cervical intraepitelial de alto grado

Esta nueva clasificación distribuye las lesiones escamosas intraepiteliales en dos grupos, las de bajo grado (LSIL), que corresponden a infecciones víricas autolimitadas que rara vez progresan a carcinoma, y las de alto grado (HSIL), donde las células ya tienen unos cambios premalignos con diferente grados de displasia e incluso carcinoma in situ.

En el año 2001, debido al avance de las nuevas tecnologías y la investigación, el NCI (National Cancer Institute) propone reevaluar y actualizar el sistema Bethesda, quedando la clasificación de la siguiente forma:

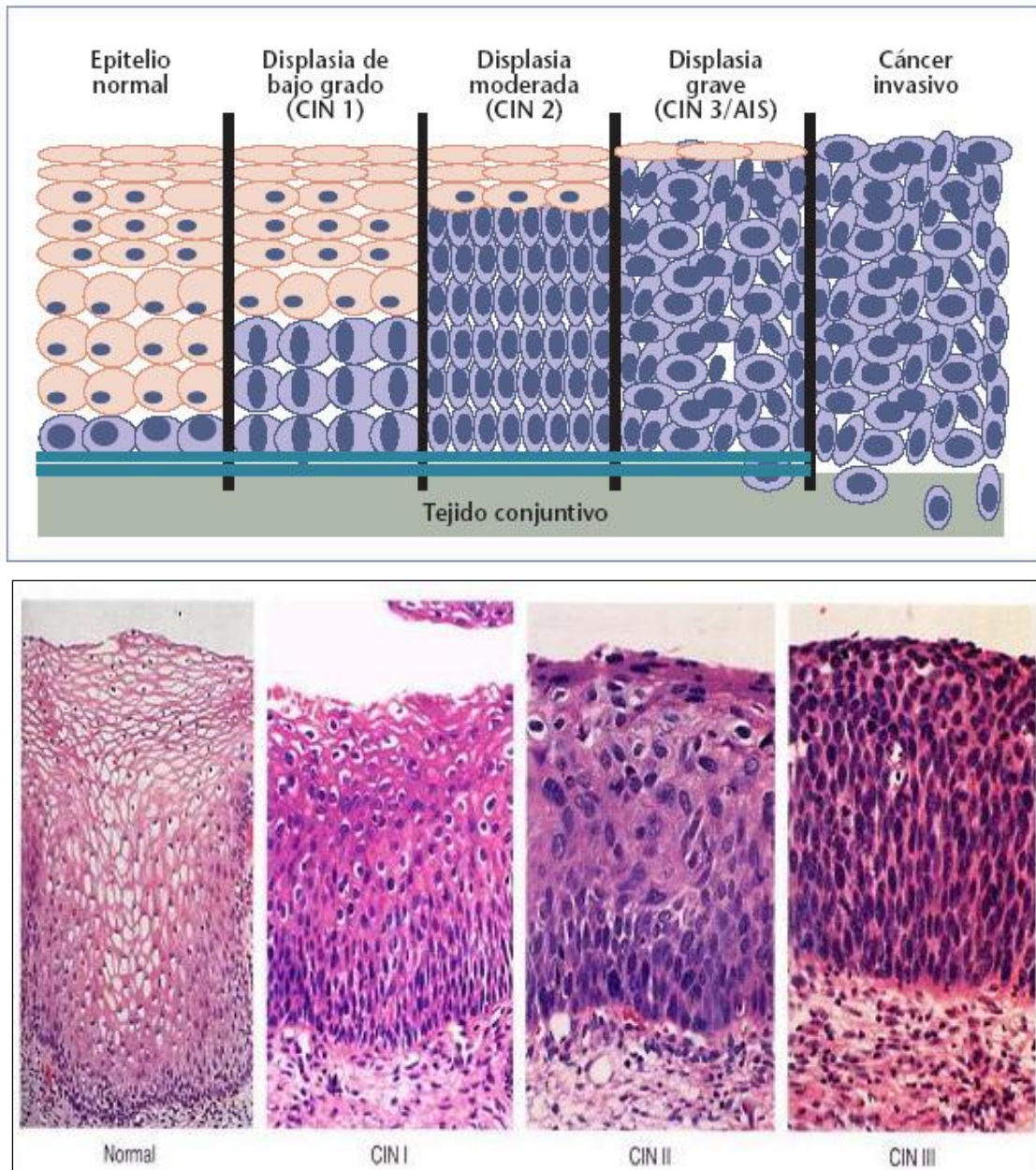
Histológicamente: CIN I, CIN II o CIN III.

Citológicamente: ASCUS, ASC.H, LSIL o HSIL¹⁷.

La posibilidad de que una lesión preinvasora acabe siendo invasora depende del grado de la misma: así, la mayoría de las CIN I regresará a la normalidad, mientras que un alto porcentaje de las CIN III progresará a cáncer. Ello depende de la carga viral de VPH y de la persistencia del virus.

Figura 8.- Lesiones preinvasivas del cérvix.

La imagen es cortesía de Talaat S. Tadros



Miller ¹⁸, hizo un seguimiento a mujeres con displasia severa (CIN III) durante 13 años. En este tiempo, solamente el 14% de las pacientes tuvieron una progresión de la enfermedad a carcinoma y un 25% de las pacientes quedaron libres de enfermedad.

CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LOS TUMORES DE CÉRVIX

La zona de transición escamocolumnar está sometida a continuos cambios metaplásicos, mas acusados en caso de infección por HPV (Virus del Papiloma Humano), que pueden progresar en el tiempo a carcinoma cervical invasivo.

Al igual que en las lesiones preinvasoras, la mayoría de los carcinomas de cérvix uterino independientemente de su tipo tienen lugar en esta zona.

Cuando el tumor rompe la membrana basal hablamos de un carcinoma invasivo.

Morfológicamente los carcinomas de cérvix podemos clasificarlos como¹⁹:

Tumores escamosos y precursores	Carcinoma escamoso	Queratinizante	
		No queratinizante	
		Basaloide	
		Verrucoso	
		Condilomatoso (Warty)	
		Papilar	
		Tipo linfoepitelioma	
		Escamotransicional	
	Carcinoma escamoso microinfiltrante		
	Carcinoma escamoso intraepitelial		
Tumores glandulares y precursores	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma mucinoso	Endocervical
			Intestinal
			De células en anillo de sello
			Microinfiltrante
			Villoglandular
		Adenocarcinoma endometrioide	
		Adenocarcinoma de células claras	
		Adenocarcinoma seroso	
		Adenocarcinoma mesonéfrico	
	Adenocarcinoma microinfiltrante		
	Adenocarcinoma in situ		
Otros tumores epiteliales	Carcinoma adenoescamoso	Variante de células esmeriladas (Glassy)	
	Carcinoma adenoide quístico		
	Carcinoma adenoide basal		
	Tumores neuroendocrinos	Carcinoide	
		Carcinoide atípico	
		Carcinoma de células pequeñas	
		Carcinoma neuroendocrino de células grandes	
	Carcinoma indiferenciado		

Tabla 2.- Clasificación de los tumores cervicales.

➤ Tumores epiteliales.

El carcinoma Epidermoide o escamoso es el tipo histológico más frecuente de tumor cervical, representa el 85% de los casos diagnosticados según la WHO (organización mundial de la salud). El adenocarcinoma constituye el segundo tipo en frecuencia en el cérvix uterino, diagnosticado en el 10 - 12% de los casos.

Tipos de tumores escamosos:

- Carcinoma epidermoide microinfiltrante

El carcinoma de cérvix microinfiltrante es un tumor que solo se detecta con el microscopio. No penetra en la pared más de 3mm y su extensión es menor de 7 mm. Por este motivo solo se encuentra en el estudio microscópico de las muestras remitidas al laboratorio.

Se caracteriza por la presencia de nidos celulares que sobrepasan la membrana basal, acompañados de una reacción desmoplásica estromal. Según la clasificación FIGO correspondería al estadio IA.

Generalmente hacen una conización, que, si incluye la totalidad del tumor, los márgenes se encuentran limpios y no va acompañado de invasión vascular no suelen tratar a la paciente, ya que no debería metastatizar.

- Carcinoma epidermoide infiltrante

La gran mayoría de los carcinomas de cérvix se originan a partir de una lesión precursora, la neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (HSIL), y el papel más relevante en esta patogenia del cáncer uterino lo desempeña el HPV de alto riesgo, el cual aparece en el 99,7% de estas neoplasias.

Macroscópicamente son tumores endofíticos, el cérvix puede estar agrandado pero está recubierto por un epitelio intacto.

Los tumores pueden variar en el patrón de crecimiento, el tipo celular y el grado de diferenciación.

Pueden infiltrar en forma de nidos, cordones... y con diferentes grados de infiltrado inflamatorio acompañante.

Según la clasificación de la OMS los carcinomas infiltrantes de cérvix se pueden dividir en tres grandes grupos:

- Carcinoma epidermoide queratinizante de célula grande.
- Carcinoma epidermoide queratinizante de célula pequeña.
- Carcinoma epidermoide no queratinizante de célula grande.

Según si existen perlas de queratina o no.

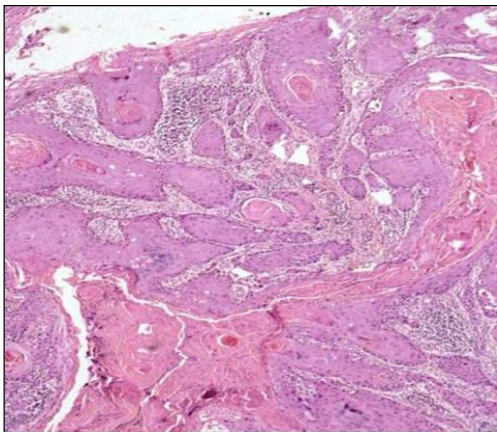


Figura 9. Carcinoma epidermoide infiltrante de cérvix tipo queratinizante de célula

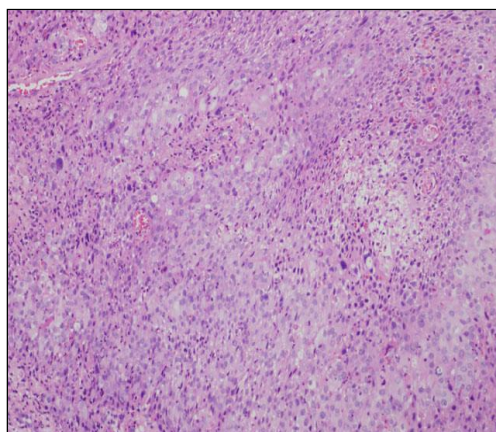


Figura 10. Carcinoma epidermoide infiltrante de cérvix tipo no queratinizante de célula

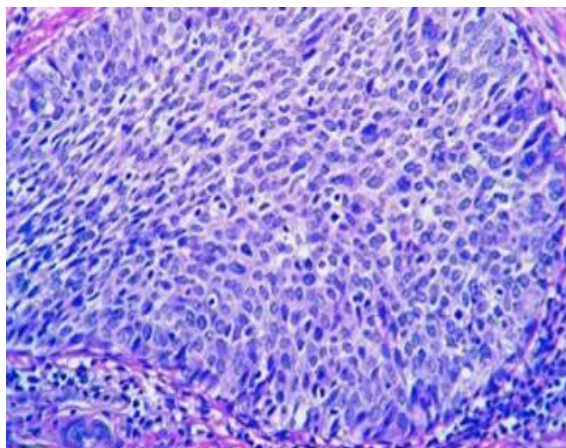


Figura 11. Carcinoma epidermoide infiltrante de cérvix de tipo no queratinizante de célula pequeña.²⁰

Atendiendo al grado de diferenciación se clasifican como:

- Grado 1: tumores bien diferenciados caracterizados por la presencia de perlas córneas y células queratinizadas, discreta atipia nuclear y una actividad mitótica no muy importante.
- Grado 2: moderadamente diferenciados constituidos por células no queratinizadas, con un mayor pleomorfismo nuclear y frecuentes mitosis.
- Grado 3: pobremente diferenciados en el que observamos células de menor tamaño, con un importante pleomorfismo y actividad proliferativa

Algunas variantes de carcinoma epidermoide:

- Carcinoma escamoso basaloide

Es una entidad muy poco frecuente, que muestra una mezcla de características entre diferenciación basaloide y escamosa.

El tumor está compuesto por nidos con células de aspecto inmaduro, a veces con signos de queratinización y otras veces asociado a componente Sarcomatoide.

Dentro de este grupo podemos encontrar una marcada gradación de agresividad entre las diferentes entidades.

- Carcinoma de patrón verrucoso-papilar

Son tumoraciones poco frecuentes. Se caracterizan por su invasión de tejidos adyacentes con una tasa de recidiva local cercana al 50%, pero no suele metastatizar en los ganglios.

Se presentan como una lesión sésil de gran tamaño. Se suele asociar con la infección por HPV de tipo 16.

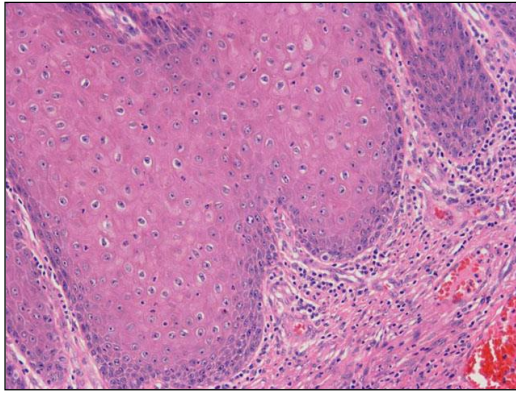


Figura 12. Carcinoma verrucoso de cérvix (patrón de crecimiento expansivo).²⁰

- Carcinoma tipo Linfoepitelioma

No presenta signos de queratinización, pero si un abundante infiltrado inflamatorio linfocitario. Suele estar asociado al virus de Epstein-Barr, y solo se asocia a HPV en raras ocasiones²¹.

El diagnóstico diferencial se realiza con la hiperplasia folicular y con el linfoma.

Esta variante de carcinoma está localizada principalmente en Asia y su evolución clínica suele ser relativamente indolente.

Otros tumores:

- Carcinoma de células fusiformes(Carcinoma Sarcomatoide)

Es una variante rara de carcinoma epidermoide pobremente diferenciado y que plantea un diagnóstico diferencial con sarcoma y con melanoma²². El tumor está formado por células de tamaño mediano, fusiformes, con núcleos ovoideos dispuestas en fascículos y algunas de ellas pueden presentar signos de queratinización. En la mayoría de los casos el tumor lo forman las células fusiformes dispuestas en un abundante estroma mixoide.

➤ Tumores glandulares.

Tipos de tumores glandulares:

- Adenocarcinoma de cérvix

La incidencia del adenocarcinoma infiltrante del cérvix uterino ha ido aumentando en los países occidentales²³. Representa entre el 15-25% de todos los carcinomas infiltrantes en esta localización. Las dos principales razones que explican este incremento son la infección por el VPH y el uso de anticonceptivos orales²⁴. La mayoría de los estudios epidemiológicos sugieren que existe un mayor riesgo de presentar un adenocarcinoma infiltrante de cérvix en mujeres que usan anticonceptivos orales, aunque parece que esto solo afectaría en determinados tipos de adenocarcinoma, como el adenocarcinoma villoglandular y carcinoma adenoescamoso.

En relación al VPH, en el carcinoma epidermoide el tipo más frecuente es el VPH 16, mientras que en el adenocarcinoma el tipo más frecuentemente identificado es el VPH 18.

Su forma de presentación es variable pudiendo hacerlo como una formación polipoide, exofítica y papilar o como una ulceración a nivel cervical.

Microscópicamente se aprecia una proliferación glandular que puede ser variable según el grado de diferenciación y el tipo de adenocarcinoma.

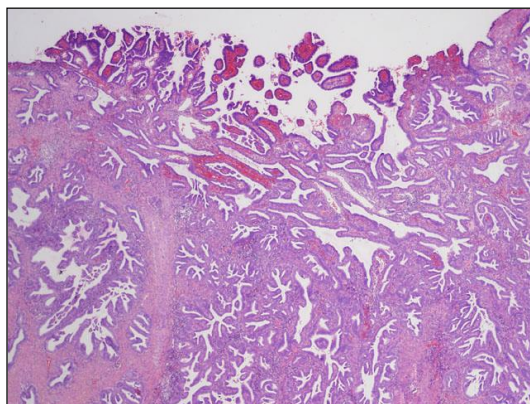


Figura 13. Adenocarcinoma de cérvix de tipo endocervical.²⁰

Sus principales variantes histológicas son:

- Adenocarcinoma mucinoso: Es el tipo más frecuente (70%) de adenocarcinoma. Sus células producen mucina.

Se definen diferentes tipos de adenocarcinoma mucinoso en función de sus características histológicas:

- Tipo endocervical. Es el tipo más frecuente de adenocarcinoma de cérvix. Recuerda a la celularidad del epitelio glandular endocervical.
- Tipo intestinal .Tiene un patrón de células en anillo de sello, por lo que habría que hacer un diagnóstico diferencial con tumores del tracto gastrointestinal.
- Adenocarcinoma villoglandular: Es una adenocarcinoma bien diferenciado, polipoide, de crecimiento exofítico típico de mujeres jóvenes que presenta muy buen pronóstico sin apenas evolución metastásica. Se ha relacionado con la toma de anticonceptivos orales.

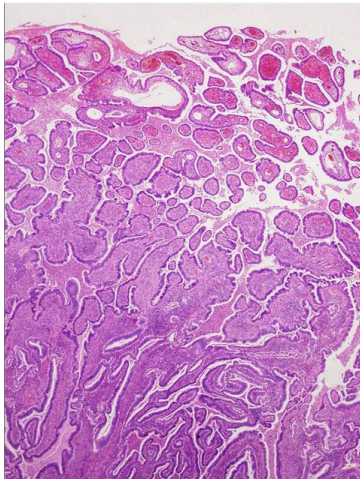


Figura 14. Adenocarcinoma villoglandular de cérvix.²⁰

- Adenocarcinoma endometriode: Desde el punto de vista citológico y arquitectural se parece al adenocarcinoma de endometrio. Requiere hacer diagnóstico diferencial con la extensión de un tumor endometrial. Este tipo se puede asociar a un adenocarcinoma endometriode de ovario.

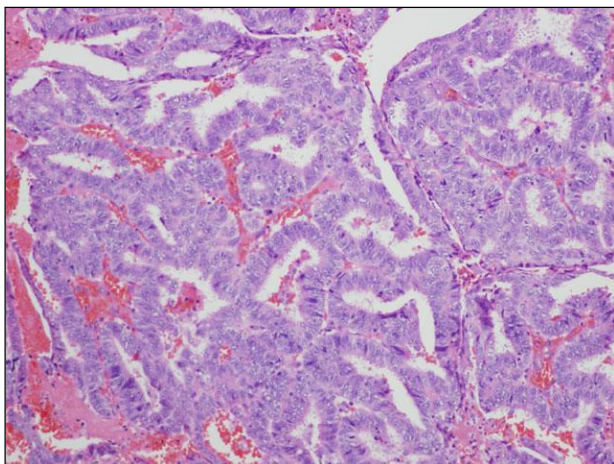


Figura 15. Adenocarcinoma endometrioide de cérvix.²⁰

- Adenocarcinoma de células claras: Afecta a mujeres de 7 a 30 años y puede presentar distintos patrones arquitecturales. Dentro de este subtipo de adenocarcinoma hay tres variedades histológicas: tubuloquistica, sólida y papilar. Las formaciones tumorales están cubiertas por células claras en tachuela, ricas en glucógeno.

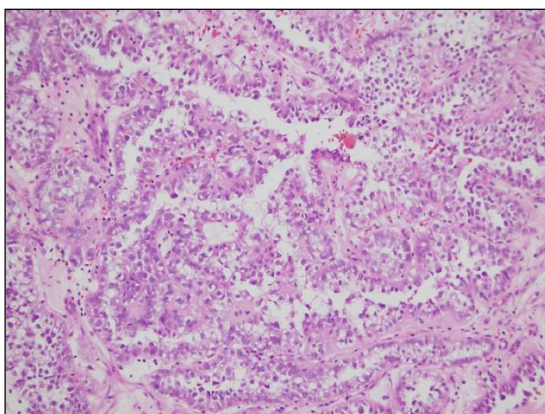


Figura 16. Adenocarcinoma de células claras de cérvix²⁰.

- Adenocarcinoma seroso: Tipo histológico muy raro cuyo aspecto histológico recuerda al de ovario, endometrio o vejiga. Muy agresivo, con metástasis ganglionares precoces.
- Adenocarcinoma mesonéfrico: Tumores muy poco frecuentes que se desarrollan donde se localizan los restos mesonéfricos.

- Adenocarcinoma de microinfiltrante: Se trata de un adenocarcinoma bien diferenciado en el que las células no muestran características de malignidad.

➤ OTROS TUMORES EPITELIALES DEL CERVIX

- Carcinoma adenoescamoso: Tumor mixto (componente escamoso y adenomatoso) que supone el 20% -25% de los tumores cervicales. Tiene mal pronóstico. Es el tipo que más frecuentemente aparece en embarazadas.

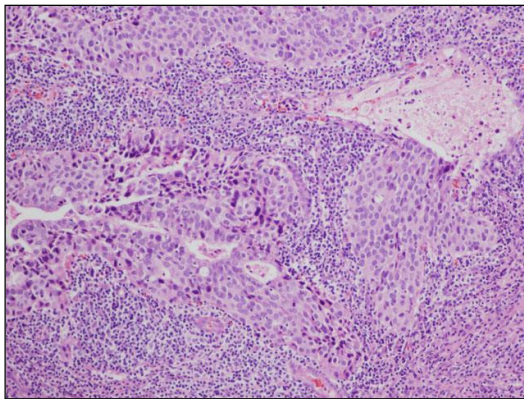


Figura 17. Carcinoma adenoescamoso de cérvix.²⁰

Una variante del carcinoma adenoescamoso sería el Carcinoma adenoescamoso de células vítreas o "Glassy cell" carcinoma: Tumor muy poco frecuente. Mal diferenciado y muy agresivo.

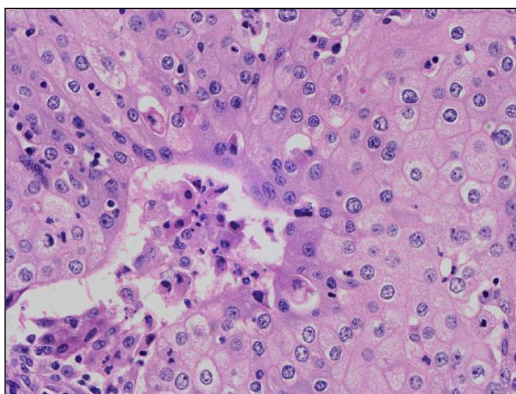


Figura 18. Carcinoma con células en vidrio esmerilado (Glassy cell carcinoma) ²⁰

- Carcinoma adenoide quístico: Tumor poco frecuente que aparece en pacientes mayores frecuentemente asociado a CIN. Mal pronóstico.
- Carcinoma adenoide basal: Muy parecido al anterior. Se diferencia en la presentación en forma de cordones celulares. Buen pronóstico.

- Tumores neuroendocrinos: tumor carcinoide, carcinoma de células pequeñas, carcinoma neuroendocrino de células grandes. El carcinoma de células pequeñas es el más frecuente. Para la tinción inmunohistoquímica presentan un perfil similar al de cualquier tumor neuroendocrino de otra localización y al igual que ellos son tumores agresivos y de mal pronóstico.

CLINICA Y DIAGNOSTICO DEL CANCER DE CERVIX

SÍNTOMAS DEL CANCER DE CÉRVIX

En la mayor parte de los casos, cuando aparecen lesiones intraepiteliales o levemente invasivas son asintomáticas, y generalmente se detectan por un screening rutinario.

La primera manifestación del carcinoma cervical invasivo, suele ser un sangrado vaginal anormal, que ocurre tras el coito, entre menstruaciones, o en las mujeres menopáusicas.

Cuando las lesiones son más avanzadas, pueden presentar un flujo sanguinolento y amarillento de mal olor. Si la pérdida de sangre se cronifica, pueden aparecer síntomas de anemia, así como fatiga y mareos.

No suele presentarse con dolor hasta estadios muy avanzados, y suele ser debido a la invasión del tumor a otros tejidos, o por la enfermedad inflamatoria crónica coexistente.

Si el dolor se localiza en la zona lumbosacra se podría sospechar una afectación de los ganglios linfáticos paraaórticos, o bien una nefrosis complicada.

El dolor ciático, edema en la extremidad inferior e hidronefrosis podría indicar una extensa afectación de la pared pélvica.

En raras ocasiones podría manifestarse un dolor epigástrico, en esos casos cabría pensar en una metástasis en los ganglios linfáticos paraaórticos altos.

En estados muy avanzados de la enfermedad podrían aparecer síntomas vesicales, o rectales, debidos a la extensión directa del tumor²⁵.

DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE CÉRVIX

El diagnóstico precoz del carcinoma de cérvix puede ser complicado principalmente por tres factores:

- la enfermedad es asintomática en estadios precoces.
- La localización de algunos tumores en el canal endocervical o no superficiales impiden la visualización mediante un examen con especulo.
- Aunque pequeña, no hay que despreciar, la tasa de falsos negativos en citologías vaginales de mujeres que se someten regularmente a estas pruebas.

La visita al médico suelen realizarla las pacientes por un sangrado anormal, o por una citología de control positiva para células malignas.

Después de una exhaustiva búsqueda de información sobre la paciente y sus hábitos, y un examen físico para valorar su estado general, se debe confirmar con una biopsia el resultado obtenido en la citología vaginal.

Biopsias cervicales:

Se puede obtener las biopsias de cérvix de diferentes maneras:

- Biopsia colposcópica.

Para la obtención de la biopsia se observa el cuello uterino con el colposcopio, se elige la zona alterada y se toma un pequeño fragmento con unas pinzas.

La colposcopia a veces es molesta pudiendo emplearse anestésicos locales.

Cuando no se ve claramente la zona de la lesión, generalmente en la zona endocervical (área de riesgo de infección por HPV), el médico hará un curetaje o raspado endocervical y lo enviara al laboratorio para analizar.

- Biopsia de cono o Conización.

Es una biopsia tomada en forma de cono que se compone de exocervix y canal endocervical. Esta zona de transición exo-endocervical es el lugar donde con mayor probabilidad se desarrollan las lesiones premalignas y los carcinomas in situ.

La conización también puede ser curativa, ya que a veces, cuando los tumores son pequeños pueden ser extirpados por completo.

Pruebas complementarias

A todas las pacientes se les realiza un hemograma completo, una bioquímica sanguínea con perfil hepático y renal y un análisis de orina

Ya que la extensión de la enfermedad es crucial para planificar el tratamiento, se utilizan técnicas de imagen para mayor precisión.

Para valorar la estadificación se utilizan: histeroscopia, cistoscopia, rectoscopia, pielografía endovenosa y radiografía de tórax y de huesos.

Otras pruebas como la linfografía, TAC (tomografía axial computerizada), resonancia magnética, PET (tomografía por emisión de positrones), arteriografía...son útiles para la decisión terapéutica, pero no hacen variar el estado clínico.

TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE CERVIX

Después de haber llegado al diagnóstico definitivo de cáncer cervical invasor, mediante biopsia y estudio anatomopatológico, y tras haber estudiado la posible extensión de la enfermedad mediante la exploración clínica y pruebas complementarias, habrá que plantearse la estrategia terapéutica a seguir, dependiendo en cada caso particular del estadio tumoral y de la edad y estado general de la paciente²⁶.

Planificación del tratamiento:

Existen diversas opciones terapéuticas en función del estadio clínico y factores pronósticos:

- Conización
- Traquelectomía simple o radical
- Histerectomía simple o radical
- Radioterapia radical (RDT) + Quimioterapia concomitante (QMT)

En estadios precoces se considera de elección el tratamiento quirúrgico ya que ofrece algunas ventajas como la conservación de la función ovárica, el mantenimiento funcional de la vagina y la facilidad para el estudio de los factores pronósticos. También en estos casos la radioterapia radical es una alternativa válida.

El tratamiento quirúrgico no es recomendable en estadios incipientes con presencia de factores de mal pronóstico que permitan prever la necesidad de tratamiento adyuvante. El objetivo es evitar la suma de morbilidad derivada de la asociación de tratamientos.

El conocimiento previo de la afectación ganglionar permite seleccionar a las pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento de radioterapia radical y quimioterapia concomitante, adecuando los campos de irradiación en caso de afectación ganglionar paraaórtica.

En estadios localmente avanzados el tratamiento de elección es la asociación radioterapia radical y quimioterapia concomitante.

ESTUDIO DE EXTENSION Y ESTADIAJE

Una vez que se confirma que la biopsia de cérvix es positiva para carcinoma, se hace un estudio de extensión, que permita conocer el estado de la enfermedad, sus factores pronósticos y que facilite la planificación del tratamiento más adecuado.

La extensión del tumor cervical puede manifestarse como una ulceración, un tumor exofítico o la infiltración extensa del tejido subyacente incluyendo la vejiga o el recto.

Además de la invasión local, el carcinoma cervical puede diseminarse a través de los ganglios linfáticos regionales o del torrente sanguíneo²⁷.

A pesar de que, en general, el cáncer cervical progresa de manera ordenada, ocasionalmente se puede presentar un tumor pequeño con metástasis a distancia. Por este motivo, se debe evaluar cuidadosamente a las pacientes en búsqueda de enfermedad metastásica.

Respecto a la diseminación linfática, se pueden diferenciar dos vías:

1. los ganglios linfáticos de la pelvis, ganglios parametrios, ganglios obturadores e hipogástricos, ilíacos externos, presacros e ilíacos comunes.
2. los ganglios paraaórticos.

Las localizaciones más frecuentes de las primeras metástasis son: ganglios paraaórticos y mediastínicos, pulmón y tejido óseo.

ESTADIFICACIÓN CLÍNICA

En el cáncer de cérvix la definición de la extensión de la enfermedad se hace mediante estadificación clínica. Esta valoración previa al tratamiento sirve para establecer el estadio de la enfermedad y poder elegir la estrategia de tratamiento más adecuada.

El estadio se determina en el momento del diagnóstico primario y no se modifica ni siquiera ante las recurrencias²⁸.

El sistema de clasificación de la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) es el más utilizado, pero esta es una clasificación eminentemente

clínica, ya que hay aspectos como la cantidad y localización de ganglios afectados, así como el tamaño del tumor, o las metástasis a distancia que no están recogidas.

Para subsanar estas deficiencias se usa también en paralelo, el sistema de estadiaje TNM, propuesto por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) que ha sido integrado a los estadios aceptados por la FIGO. Estos métodos se basan en el examen físico de la pelvis y en los estudios de diagnóstico por imagen.

Tabla3.-Estatificación de cáncer de cuello uterino de acuerdo a los criterios unificados de la AJCC y FIGO.

Tumor Primario (T). Nódulos linfáticos regionales (N). Metástasis a distancia (M).

Categoría TNM	Estadio FIGO	
TX		El tumor primario no puede evaluarse
T0		No hay evidencia de tumor primario
Tis		Carcinoma in situ (carcinoma preinvasivo)
T1	I	Carcinoma cervical confinado al útero
T1a	IA	Carcinoma invasivo preclínico, diagnosticado microscópicamente
T1a1	IA1	Invasión estromal ≤ 3 mm de profundidad y ≤ 7 mm de crecimiento horizontal
T1a2	IA2	Invasión estromal > 3 mm y ≤ 5 mm en profundidad, con un crecimiento horizontal ≤ 7 mm
T1b	IB	Lesión clínicamente visible confinada al cérvix o lesión microscópica mayor que T1a/IA2
T1b1	IB1	Lesión clínicamente visible ≤ 4 cm en su mayor diámetro.
T1b2	IB2	Lesión clínicamente visible > 4 cm en su mayor diámetro.
T2	II	Carcinoma cervical que invade más allá del útero, pero no a la pared pélvica o el tercio inferior de la vagina
T2a	IIA	Tumor sin invasión del parametrio
T2a1	IIA1	Lesión clínicamente visible ≤ 4 cm en su mayor diámetro
T2a2	IIA2	Lesión clínicamente visible > 4 cm en su mayor diámetro
T2b	IIB	Tumor con invasión del parametrio, sin llegar a la pared pelviana
T3	III	Tumor que se extiende a la pared pélvica y/o invade el tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis o alteración de la función renal
T3a	IIIA	El tumor afecta el tercio inferior de la vagina, sin extensión a la pared pélvica
T3b	IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o riñón no funcionando
T4	IVA	El tumor invade la mucosa de la vesical o l rectal y/o se extiende más allá de la pelvis

Tabla 4.-Estadificación de cáncer de cuello uterino de acuerdo a los criterios unificados de la AJCC y FIGO. Nódulos Linfáticos Regionales(N).

Categoría TNM	Estadio FIGO	
NX		Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0		No hay ganglios linfáticos regionales metastásicos
N1	IIIB	Presencia de ganglios linfáticos regionales metastásicos

Tabla 5.-Estatificación de cáncer de cuello uterino de acuerdo a los criterios unificados de la AJCC y FIGO. Metástasis a distancia (M) ²⁹.

Categoría TNM	Estadio FIGO	
M0		No hay metástasis a distancia
M1	IVB	Metástasis a distancia (incluyendo siembra peritoneal, ganglios linfáticos supraclaviculares, mediastínicos o Paraaórticos, pulmón, hígado o hueso)

Tabla 6.-Agrupación por estadios de FIGO/TNM (2010)³⁰

ESTADIO FIGO	T	N	M
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio IA	T1a	N0	M0
Estadio IA1	T1a1	N0	M0
Estadio IA2	T1a2	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio IIA	T2a	N0	M0
Estadio IIA1	T2a1	N0	M0
Estadio IIA2	T2a2	N0	M0
Estadio IIB	T2b	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T3a	N0	M0
Estadio IIIB	T3b	Cualquier N	M0
	T1-3	N1	
Estadio IVA	T4	Cualquier N	M0
Estadio IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1

ESTADIAJE QUIRÚRGICO DE LA DISEMINACIÓN REGIONAL

La indicación del estadiaje quirúrgico es controvertida. Consiste esencialmente en el muestreo linfático aórtico y pélvico, y la exploración directa del sistema parametrial para reconocer de un modo más seguro la extensión de la enfermedad. Quienes abogan por este procedimiento lo hacen en base a poder identificar pacientes con afectación microscópica de ganglios paraaórticos o en iliaca común las cuales pueden beneficiarse de campos extendidos de irradiación.

5.-BIOLOGIA MOLECULAR DEL CARCINOMA DE CERVIX

CICLO CELULAR

A lo largo de toda la vida de los seres vivos, hay una regeneración constante de las células para el mantenimiento de los tejidos. Aunque el ciclo vital de cada tipo celular es diferente en su duración y frecuencia, en todos ellos ocurre de la misma manera.

El ciclo celular es una serie ordenada de eventos por el cual la célula crece, duplica su material genético y se divide para dar lugar a dos células hijas idénticas, que contienen la misma información genética.

▪ FASES DEL CICLO CELULAR

En el ciclo celular podemos observar dos etapas diferenciadas: la interfase, y la fase de división o fase M (Mitosis en las células somáticas).

Mientras que algunas células están continuamente proliferando, entran en división tras completar cada interfase, otras pasan a un estadio G0 o quiescente, que durara días, años, o incluso algunas células no volverán nunca a dividirse como les ocurre a las neuronas.

La interfase, es la etapa en que la célula no se está dividiendo. En esta fase la célula realiza sus funciones específicas. En el caso de que esté preparada para proliferar, comenzara a formar todos los factores necesarios para llevar a cabo la duplicación de su ADN y la mitosis.

La interfase es el periodo que tiene lugar entre dos divisiones sucesivas. Es la etapa más larga, y podemos dividirla a su vez en tres fases:

La fase G1 (gap1) es un periodo de 6-12 horas posteriores a la división celular, y previo a la síntesis del DNA. En esta fase la célula está muy activa, sintetiza RNA y proteínas para la formación de todos sus orgánulos, aumentando el tamaño celular.

Sintetiza todo el mecanismo de replicación y aumenta su ATP para obtener energía suficiente para encarar la siguiente fase.

La célula debe comprobar que las condiciones generales para llevar a cabo la síntesis de DNA son favorables.

Las células normales se reproducen en respuesta a una "cascada" de señales que les envían los factores de crecimiento externos y detienen su división en respuesta a factores inhibidores que, obviamente, actúan también por medio de una cascada de señales.

La fase S, es en la que tiene lugar la síntesis del DNA, duplicándose el contenido de DNA de la célula.

La fase G2 (gap2) es un periodo de 3-4 horas posterior a la duplicación del DNA. En él también hay síntesis de RNA y proteínas y acúmulo de ATP. Se sintetizan todas las proteínas necesarias para mitosis, tanto para la formación del huso acromático, como para la división celular. En esta fase las células se preparan para la escisión en dos células hijas³¹.

Durante la fase M o mitosis, se produce una separación ordenada del material genético en dos partes exactamente iguales que se separaran físicamente en dos células hijas.

En el ciclo celular hay dos puntos críticos o de restricción:

- El punto de transición G1-S donde la célula comprueba si está preparada para entrar en la fase de síntesis, si tiene las señales mitogénicas, si la célula ha alcanzado un tamaño adecuado para su división, y si tienen nutrientes suficientes para comenzar la siguiente fase. Superado este punto, supone la entrada irreversible en el ciclo celular.
- El punto de transición G2-M es de gran importancia. En este punto la célula debe comprobar si la duplicación del DNA ha sido adecuada y si no hay daños en el DNA. Si hubiera errores, se generarían las señales adecuadas que pondrían en marcha los mecanismos de reparación, o bien la muerte celular programada (apoptosis).

- **REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR**

La progresión del ciclo celular está controlada por múltiples factores de crecimiento, los cuales determinan el comportamiento de la célula, incluyendo la decisión de crecer, diferenciarse o morir por apoptosis. Todos estos factores actúan en el ciclo celular afectando a las proteínas que lo regulan.

La proliferación celular es estrictamente regulada por un delicado balance entre señales activadoras e inhibidoras.

- Señales activadoras e inhibidoras del ciclo celular

El control del ciclo celular es regulado por la actividad de las enzimas Quinasas dependientes de ciclina (CDK1,CDK2,CDK4,CDK6), sus coenzimas activadoras (las ciclinas A,B,D,E) y los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina(CDKI)³².

Entre las proteínas reguladoras positivas más importantes se encuentran las proteínas quinasas dependientes de ciclina (CDK), cuya función es fosforilar otras proteínas en residuos de serina y treonina, activando o inhibiendo dichas proteínas.

Las quinasas dependientes de ciclina solo son activas cuando están formando complejo con una proteína de ciclina determinada. Estos complejos son los reguladores clave para la transición de una fase a otra del ciclo celular.

Las ciclinas son proteínas reguladoras de vida corta, que se diferencian según el momento del ciclo en el que intervienen y cuyo nivel fluctúa durante las diferentes etapas del ciclo.

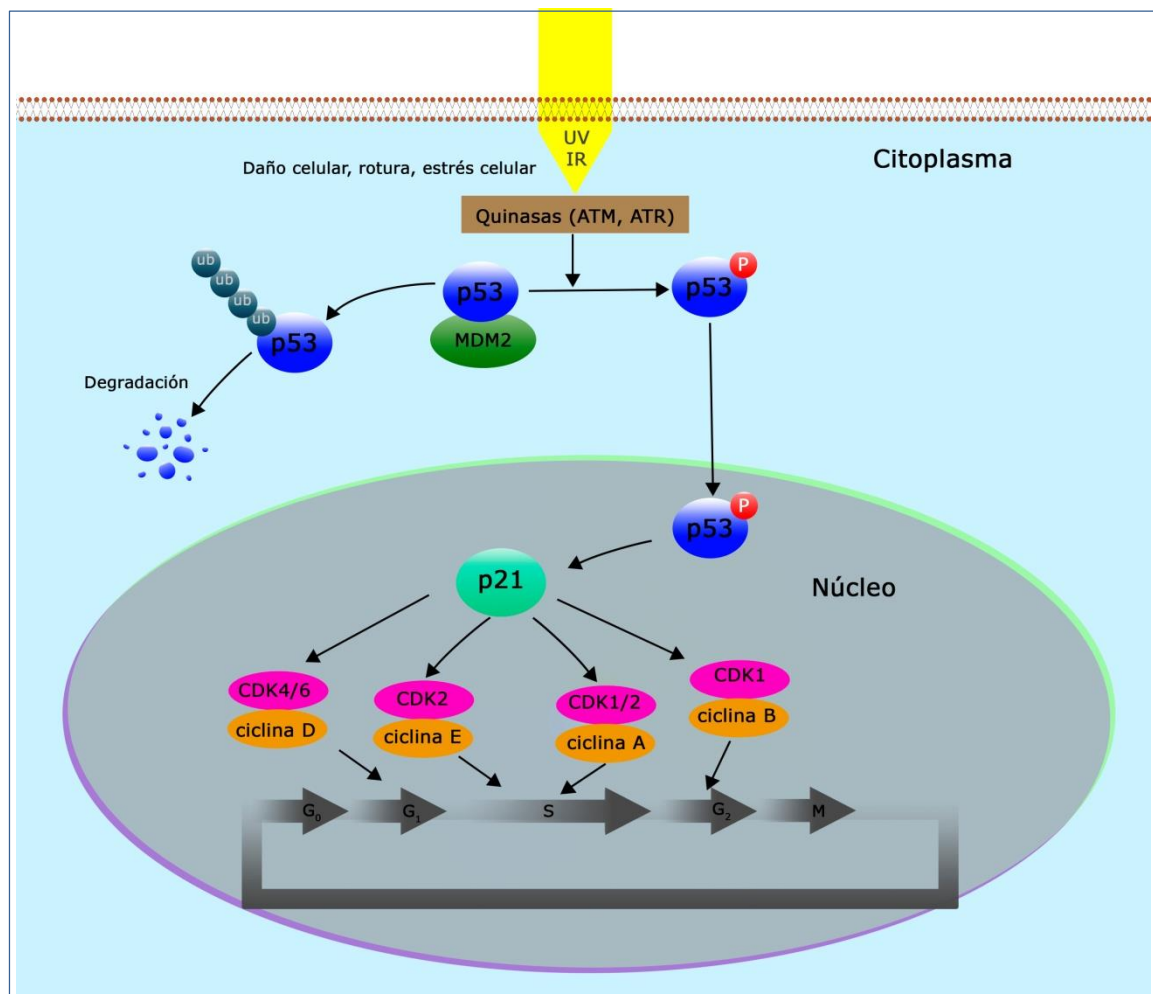
Según las diferentes fases del ciclo celular encontraremos diferentes ciclinas y quinasas³³:

Tabla 7.- Quinasas y ciclinas activas en cada fase del ciclo celular.

Fase Mitosis	Ciclinas	Quinasas
G1	Ciclina D	Cdk 4,6
G1/S	Ciclina E	Cdk 2
S	Ciclina A	Cdk 2
M	Ciclina B	Cdk 1

Figura 18.- Representación de la activación de p53 por daño en el DNA.

Modificado de The medical biochemistry. Cortesía de Carlos de Lucas.



Hay dos grandes grupos de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CKI):

- La familia INK4 compuesta por: p16, p15, p18 y p19.
- La familia Cip/Kip compuesta por: p21, p27, y p57.

Todas estas proteínas inhibidoras, interactúan con las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6, ocasionándoles un cambio conformacional que impide su unión con la ciclina D.

Las proteínas de la familia CIP (CKIs-Inhibitor Proteins) bloquean a las ciclinas A, B y E. También bloquean a las quinasas dependientes de ciclina 1 y 2 e incluso a los complejos "quinasas dependientes de ciclina-ciclina" ya formados.

Al no poder formar los complejos CDK-Ciclina, por unión del inhibidor de quinasas p21 y el cambio estructural que produce, se impide la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, quedando por tanto detenido el ciclo celular en el punto de restricción G1/S³⁴.

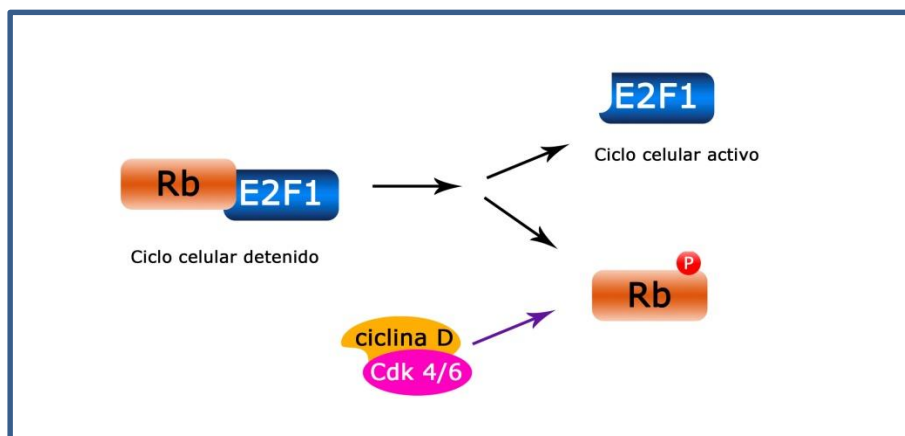
E2F es un factor de transcripción que regula la expresión de los genes necesarios para el inicio de la síntesis de DNA.

Durante la fase G1 del ciclo celular, este factor está unido a la proteína del retinoblastoma, lo que le mantiene inactivo, evitando su translocación al núcleo donde actúa. Cuando E2F está unido a la proteína del retinoblastoma, el ciclo celular está detenido³⁵.

Si todo el mecanismo de proliferación se ha puesto en marcha, se formara el complejo (enzima quinasa dependiente de ciclina 4/6– ciclina D) Cdk4/6-ciclina D, que fosforila la proteína del retinoblastoma, liberando el factor E2F que se internaliza en el núcleo, activando los genes necesarios para la síntesis de DNA y el avance a la fase S. Comienza así el ciclo celular³⁶. Si la ciclina D faltase por algún motivo, el complejo CDK2-ciclina E también es capaz de fosforilar la proteína del retinoblastoma y comenzar la fase de síntesis del DNA³⁷.

Figura 19.-Fosforilacion de la proteina del retinoblastoma.

Cortesía de Carlos de Lucas.



El gen del retinoblastoma se encuadra entre los llamados genes supresores de tumores. Son genes que codifican proteínas que regulan negativamente el ciclo celular. Por diferentes causas (una mutación o una alteración estructural de la

molécula...) la proteína del RB podría no unirse al factor E2F, quedando la célula en continua proliferación, siendo un crecimiento descontrolado dando lugar a la formación de tumores³⁸.

Otro gen supresor de tumor es el p53. La proteína p53 participa en la regulación de los puntos clave del ciclo celular, en la activación de la apoptosis (muerte celular programada) y en la diferenciación celular.

La proteína p53, se encuentra regulada negativamente por la proteína Mdm2, ya que mientras está unida a ella, la proteína p53 permanece inactiva.

Esta unión p53-Mdm2 es rota por la proteína p19, que se une a Mdm2, dejando libre y activada la proteína p53.

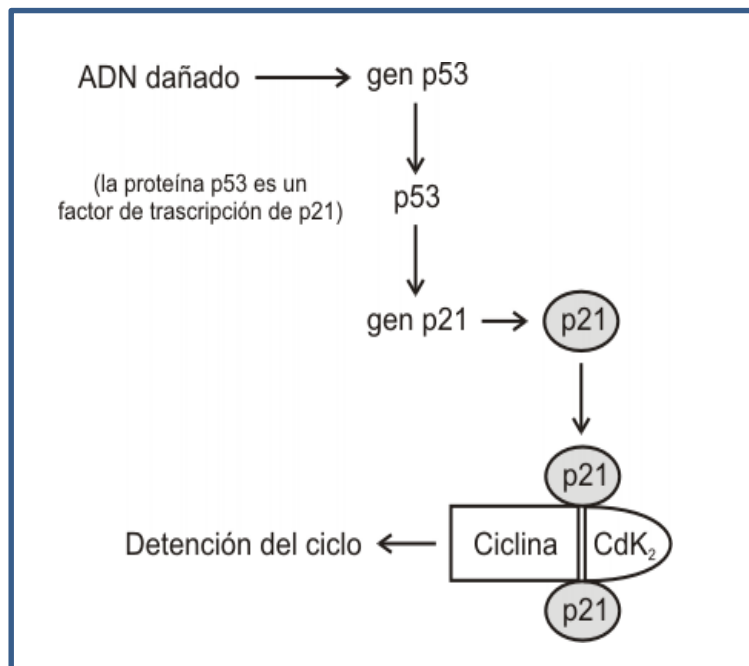
La actividad de la p53 se incrementa en respuesta a eventos que dan lugar a una proliferación anormal de la célula, tales como daño en el DNA, oncogenes activados, hipoxia, o en respuesta a ciertas señales de estrés.

Dentro del ciclo celular esta proteína actúa en los puntos de control G1/S y G2/M.

En la fase G1, si p53 es activado por un daño en el DNA que requiera ser reparado antes de iniciar la síntesis del DNA. P53 activa los genes para la síntesis de la proteína p21 que inhibe la activación del complejo CKD2-Ciclina E.

La proteína p21 también puede unirse al RNAm (ácido ribonucleico mensajero) de CDK4 para impedir su traducción. Por estos mecanismos quedaría deteniendo el ciclo en G1³⁹.

Figura 20.- Detención del ciclo celular.



Si el daño al DNA es producido después de la síntesis, el p53 detiene el ciclo en G2/M uniéndose al promotor del gen de ciclina B bloqueando su transcripción⁴⁰.

Cuando el daño en el DNA es irreparable, p53 activa los genes de las proteínas de apoptosis (BAX...) provocando la muerte celular⁴¹.

El gen p53 se encuentra mutado en la mitad de los cánceres humanos conocidos. Sin embargo la tasa de mutación en el cáncer de cérvix es pequeña. La pérdida de la función de p53 deja a las células sin uno de los mecanismos de control para inhibir el desarrollo de tumores, al no poder reparar los daños en el DNA o dirigir la célula hacia la apoptosis.

La inactividad de p53 en la célula puede ser causada de dos formas diferentes, por mutación en el gen, o por invasión de la célula por el virus del HPV.

- DESREGULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR EL VIRUS HPV

El Virus del Papiloma Humano (HPV) afecta principalmente al tracto genital femenino. Se han descrito más de 80 tipos, clasificados en alto, moderado y bajo riesgo. En relación con las lesiones que producen, podemos encontrar, desde lesiones preinvasivas a carcinoma invasor.

El genoma del HPV está formado por DNA de doble banda circular, y está protegido por una cápside. El virus no tiene maquinaria de replicación, por lo tanto se internaliza en el núcleo de las células que invade. Los virus de bajo riesgo, se introducen en la célula pero quedan en forma de episoma (independientes), siendo más fáciles de eliminar. Sin embargo los virus HPV de alto grado, integran su DNA en el DNA de la célula, usando todos sus mecanismos de traducción.

La célula invadida codifica las proteínas virales, dos de ellas de vital importancia para el ciclo celular.

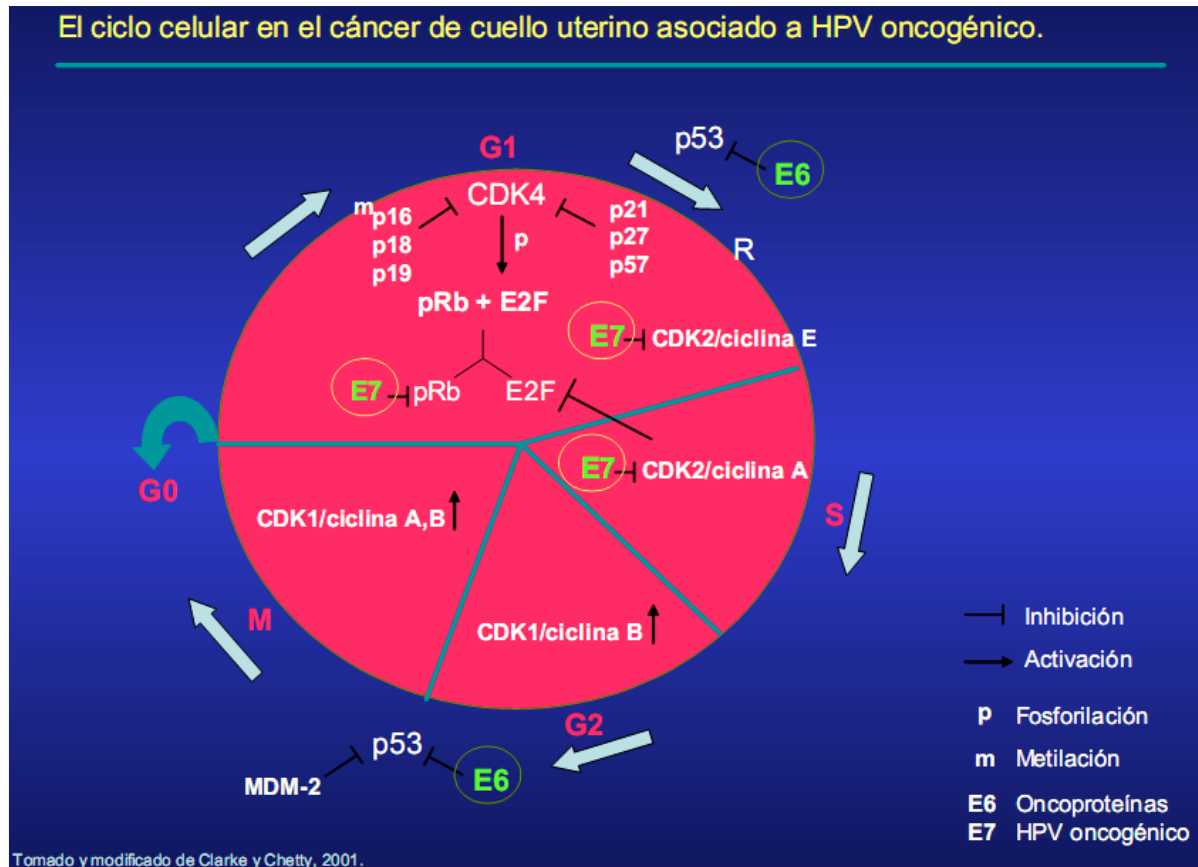
La oncoproteína E6 que se une a la proteína p53 facilitando su degradación.

La oncoproteína viral E7, se une a la proteína del retinoblastoma, de tal modo que esta libera el factor E2F, quedando continuamente activado el ciclo celular. Además, esta oncoproteína E7 inactiva también la proteína p21waf, que sería la encargada de la detención del ciclo celular⁴².

Sin ninguna de las dos principales proteínas de control del ciclo celular, la proliferación esta descontrolada y los errores del DNA no se reparan, por lo que facilita la formación de tumores malignos⁴³.

Figura 21.-Ciclo celular e interacciones de las proteínas E6 y E7 del HPV.

Modificado de Clark eand Chetty



Ciclo celular y virus:

Ante señales promotoras de proliferación, en la fase G1 del ciclo celular, se estimula la síntesis de ciclina D, que se une a CDK4 y CDK6, y de ciclina E que se une a CDK2.

Los complejos ciclina D/CDK4, ciclina D/CDK6 y ciclina E/CDK2 fosforilan a la pRb, que libera a la proteína E2F activando la transcripción de varios genes, cuyos productos son esenciales para la progresión del ciclo hacia la fase S.

Ya en la fase S, la ciclina A, se une a CDK2 y CDK1 facilitando el progreso de la célula hacia la fase G2.

Al principio de la fase G2 aparece la ciclina B, formando complejos con CDK1. Este complejo ayuda a la célula a pasar de G2 a M y fosforila diversas proteínas necesarias para la mitosis⁴⁴.

La proteína E6 se expresan muy tempranamente durante una infección por VPH. Su principal misión es desestructurar lo más rápido posible los mecanismos de control de la célula, ya que necesita utilizar toda la maquinaria replicativa de la célula para que el virus se replique.

Si p53, en condiciones normales, reconociese el material vírico, induciría a la célula a la apoptosis, y la muerte celular evitaría la replicación del virus.

La proteína E6 bloquea la degradación de p53 por Mdm2, produciéndose la degradación de este por la vía de la ubiquitina. Esta vía degrada la proteína p53 rápidamente, reduciendo su vida media de 3 horas a 20 minutos.

Esta degradación impide que p53 se acumule y active los genes que codifican para la proteína p21waf⁴⁵. Por lo tanto, p21 no inhibe a las quinasas dependientes de ciclina. Las quinasas fosforilan la proteína del retinoblastoma que libera el factor E2F, activando continuamente el proceso de síntesis y el avance constante del ciclo celular con material genético probablemente dañado, y replicando continuamente el DNA viral. Este proceso llevara a una acumulación de células dañadas que unido a otros factores de riesgo asociados pueden dar lugar al cáncer de cérvix.

Por la acción de esta oncoproteína, también puede acumularse p53 pero su función puede estar alterada debido al secuestro citoplasmático llevado a cabo por la oncoproteína viral HPV-E6 que impide que se trasfiera al núcleo, donde ejerce su función⁴⁶.

Por otros mecanismos independientes de p53, la proteína E6 puede evitar la apoptosis. Esta proteína interacciona con la proteína proapoptótica Bax⁴⁷.

La proteína E7 actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia del retinoblastoma y su interacción con los factores de transcripción como E2F. La unión de E7 a la forma fosforilada activa de la proteína del retinoblastoma conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular.

La proteína E7 también se asocia a otras proteínas celulares, como las histonas y los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina, como la proteína p21waf o la p27. La proteína p21waf es degradada rápidamente por la vía de la ubiquitina.

Estas interacciones inducen múltiples respuestas celulares. Estas proteínas estimulan la expresión de moléculas proangiogénicas⁴⁸.

- ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso imprescindible tanto para el crecimiento de los tumores de gran tamaño, pues necesitan un aporte de oxígeno y diversos factores para seguir creciendo, así como para la metastatización de los tumores.

La metástasis es un tema de estudio importante, ya que es la causa más importante en el fallo de los tratamientos oncológicos y, por consiguiente, de la muerte del paciente.

La diseminación tumoral no se lleva a cabo solo por los vasos sanguíneos, también por los vasos linfáticos.

Este proceso está controlado por un número de citoquinas y factores de crecimiento, entre los que destacan los factores de crecimiento del endotelio vascular. Entre otros efectos, producen la proliferación de células endoteliales para la formación de nuevos vasos.

En el cáncer de cervix la angiogénesis está ligada a la carcinogénesis.

Varias oncoproteínas virales del VPH están implicadas en el proceso de angiogénesis. La oncoproteína E6 inactiva p53 y a su vez desregula VEGF activando el proceso de angiogénesis en el carcinoma de cervix⁴⁹. Este proceso se relaciona directamente con la progresión de enfermedad e inversamente con la supervivencia⁵⁰.

Uno de los métodos utilizados para evaluar la angiogénesis tumoral es la medición de los microvasos por técnicas inmunohistoquímicas, marcando las

células endoteliales. Los anticuerpos más utilizados para el marcaje de vasos son: CD31, CD34 y Factor VIII.

En este estudio, el CD34 ha sido el anticuerpo de elección para el conteo de microvasos. Es un anticuerpo altamente sensible pero es necesario identificar morfológicamente las estructuras marcadas y los microvasos para comprobar su expresión.

La angiogénesis, medida mediante la densidad de microvasos, se ha asociado con el pronóstico. Los tumores con una alta densidad de microvasos tienen un peor pronóstico frente a los que tienen una menor densidad^{51,52}.

En cáncer de cérvix, un aumento de la MVD se correlaciona con una mayor incidencia de metástasis, un peor control local y peor pronóstico^{53,54,55,56}.

Los estudios de la angiogénesis, medida mediante MVD en relación con factores clásicos de pronóstico en el carcinoma cervical, no han mostrado correlación en la mayoría de las series publicadas

- REGULADORES DEL CICLO CELULAR

- p53

La proteína p53 es el producto del gen Tp53, uno de los llamados genes supresores de tumores ya que pueden promover la apoptosis (muerte celular).

P53 es una fosfoproteína de 393 aminoácidos cuyo gen codificador se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13).

Esta proteína tiene tres dominios:

El dominio N-terminal es el dominio regulador, está implicado en la activación de factores de transcripción (TA), donde se unen diferentes proteínas, facilitando o bloqueando esta acción de p53. También se encuentra en este dominio una región poli-prolina, que podría mediar las funciones apoptóticas de p53 y la supresión del crecimiento celular independiente de transcripción.

Otra región del dominio N-terminal la NES (Nuclear Export Signal), esta región regula el transporte de p53 desde el núcleo al citoplasma para su degradación por MDM-2.

El dominio central incluye la secuencia específica de unión al ADN, que permite la unión de p53 con los sitios promotores de genes diana como p21 (WAF1/Cip1).

En este dominio también se encuentran cuatro regiones conservadas reguladoras de la unión proteína – DNA⁵⁷.

Más de la mitad de los cánceres humanos tienen mutado el gen de p53, encontrándose el 90% de ellos mutados en este dominio central.

Las mutaciones pueden ser de diferentes tipos, inhibiendo la transcripción de p53, o incrementando la tasa de expresión de genes específicos como c-Myc, o MDR-1, un gen de resistencia a fármacos. Otras mutaciones en esta zona producen una radioresistencia, lo que conlleva una mejora en la reparación del DNA, o una inhibición de la apoptosis⁵⁸.

El dominio C-terminal contiene una región de oligomerización que permite la configuración de p53 en forma de tetrámeros. Una región de señalización de localización nuclear (NLS) relacionada con la translocación de p53 desde el citoplasma al núcleo. Y una región de unión con secuencias no específicas de ADN y roturas dobles de cadena inducidas por radiación ionizante, permitiendo el reconocimiento del ADN dañado y favoreciendo su papel en la reparación del daño mediado por Rad51⁵⁹.

La función de p53 en la célula es controlar la proliferación celular y la apoptosis. Cuando la célula ha sufrido un daño en el DNA, por un mecanismo en cascada detiene el ciclo celular en los puntos de control G1 o G2, antes de la replicación del DNA, para que sea reparado y continúe el ciclo, o por el contrario, promueve la apoptosis.

p53 centraliza la coordinación de los procesos relacionados con el daño celular, como son la reparación del DNA, la progresión del ciclo celular y la muerte por apoptosis. A p53 se la conoce comúnmente como el “guardián del genoma”, porque mantiene la estabilidad genética celular⁶⁰.

En condiciones fisiológicas, p53 muestra bajos niveles de la proteína, ya que tiene una vida media muy corta (10-20 minutos). La degradación de p53 es llevada a cabo por la proteína MDM2⁶¹.

En caso de daño al ADN, p53 se acumula y se activa, desarrollándose un complejo sistema de regulación. Se transcribirían los genes necesarios para la producción de la proteína p21waf, que actuaría como inhibidora de las quinasas dependientes de ciclina, deteniendo el ciclo celular hasta la reparación del DNA dañado.

Dada su corta vida, por técnicas de inmunohistoquímica no podemos detectar la proteína p53 salvaje, solo podemos detectar la proteína p53 mutada.

Las mutaciones de p53 son frecuentes en los carcinomas invasivos. En estos casos pierde su función de supresor de tumor y actúa con funciones oncogénicas.

En el cáncer cervical la mutación de p53 parece ser un evento tardío⁶².

- p21^{waf}

El desarrollo y progresión del cáncer está íntimamente ligado al ciclo celular, sus componentes y sus puntos de control.

El control del ciclo celular es regulado por la actividad de las enzimas quinasas dependientes de ciclina (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6), sus coenzimas activadoras las ciclinas (A, B, D, E) y los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CDKI)

Hay dos grandes grupos de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKI):

- La familia INK4 compuesta por: p16, p15, p18 y p19.
- La familia Cip/Kip compuesta por: p21waf, p27, y p57^{63,64,65}.

La proteína p21waf, también llamada CDKN1A (Inhibidor de la kinasa dependiente de ciclina 1A) esta codificada por el gen p21 localizado en el cromosoma 6(6p21.2).

Su función principal es detener el ciclo celular en células con mutaciones o alteraciones génicas en su DNA, para permitir su reparación antes de duplicarse.

Diferentes estudios sugieren que p21waf juega un papel importante en la decisión del destino de la célula durante el crecimiento y la diferenciación.

En un principio se pensaba que su función era solo dependiente de P53, producto de un gen antitumoral que actúa en la célula como factor de transcripción⁶⁶.

Este factor p53, cuando el DNA de la célula ha sufrido un daño, induce la expresión de p21 waf, que a su vez inhibe los complejos de quinasa dependientes de ciclina CDK2 y CDK4 (y defosforila el p-Rb) deteniendo el ciclo celular en el punto de transición G1 /S hasta que el DNA ha sido reparado, o induce a la célula a apoptosis^{67,68}.

La proteína p21waf se expresa tanto en células detenidas en la fase G1 del ciclo celular como en apoptosis^{69,70}.

Posteriormente se ha comprobado cómo puede ser activado por otras vías no dependientes de p53. Y paradójicamente puede actuar tanto como supresor de tumor como de oncogen. Esta vía independiente de p53 es llevada a cabo por factores de crecimiento celulares como el factor de crecimiento derivado de plaquetas(PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos(FGF) y el factor de crecimiento epidérmico(EGF).

P21waf puede inhibir la proliferación celular independiente de CDK2, inhibiendo el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), que se requiere para la progresión de la fase S y modulando las vías de reparación de ADN dependientes de PCNA.

P21waf también puede ser fosforilada por AKT1, señalización que le impide su translocación al núcleo. La proteína p21waf en el citoplasma tiene una actividad anti-apoptótica ya que inhibe proteínas implicadas en la apoptosis^{71,72,73}.

La expresión de p21waf en general es controlada a nivel transcripcional, dependiente o independiente de p53, pero también puede ser regulada a nivel postrancricional

La mutación en el gen p21 rara vez es detectada en el carcinoma de cérvix.

- PROLIFERACIÓN: KI67.

Gerdes et al., (1983)⁷⁴ describieron un anticuerpo monoclonal de ratón, Ki-67, que reaccionaba con un antígeno nuclear de células en proliferación activa. Sus estudios experimentales en células estimuladas con mitógenos demostraron que el anticuerpo reconocía un antígeno presente en todas las fases del ciclo de división celular (G1, S, G2, M). Sin embargo, no reaccionaba con células quiescentes en fase G0 ni con células en la fase G1 precoz que habían sido estimuladas por primera vez

con mitógenos. La inmunotinción con Ki-67 desvelaba una reactividad nuclear en varias líneas de células humanas en división celular activa (células corticales del timo, células germinales del centro de folículos corticales, células de la región del cuello de la mucosa gástrica, espermatogonias indiferenciadas) y por el contrario, carecía de efecto en células bien diferenciadas (linfocitos, monocitos, hepatocitos, células renales, células parietales de la mucosa gástrica y células cerebrales). La expresión del antígeno reaparecía en linfocitos tras ser estimulados con un mitógeno (fitohemaglutinina) y desaparecía en las células HL-60 inducidas a diferenciarse a macrófagos maduros por exposición a ésteres de forbol. Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de utilizar el antígeno Ki-67 para valorar la fracción de crecimiento, es decir, la proporción de células que se están dividiendo en un tumor.

Entre las primeras aplicaciones clínicas del anticuerpo contra el antígeno Ki-67 destacan los trabajos de Gerdes et al., (1984)⁷⁵ en linfomas no Hodgkin. Estos autores, utilizando la mediana de expresión como parámetro de discriminación, lograron correlacionar linfomas de alto y bajo grado de la clasificación de Kiel con elevadas y bajas tasas de división celular respectivamente.

Se denomina fracción de crecimiento a la proporción de células tumorales que se encuentra en el conjunto de las células en proliferación. La fracción de crecimiento tumoral es un factor que influye en el comportamiento de la neoplasia, por lo que la medición de este parámetro proporciona al clínico información de pronóstico y también sobre la respuesta tumoral ante la aplicación de cualquier terapia.

La actividad proliferativa de un tumor se mide a través de la expresión inmunohistoquímica de diferentes proteínas, que sólo se expresan en células que se encuentren en fase proliferativa. Entre los antígenos que se han evaluado ampliamente tenemos a Ki-67 y PCNA.

La utilización del anticuerpo Ki-67 es considerada un medio sencillo, reproducible y confiable para evaluar en muestras de tejido, la fracción de crecimiento de las neoplasias malignas con relativa exactitud.

6.-FACTORES PRONOSTICOS EN EL CANCER DE CERVIX

Los factores pronósticos son los que nos ayudaran a hacer una predicción sobre la evolución de la enfermedad, la recurrencia e incluso el final de la vida del paciente.

Es muy importante conocer las características del tumor, así como las características clínicas de las pacientes, con el fin de hacer grupos homogéneos para la aplicación de terapias y estandarización de resultados.

Incluso una vez hecha esta distribución, pacientes con características similares tienen respuestas al tratamiento muy diferentes.

Hay gran cantidad de estudios que investigan sobre los factores pronósticos de cada tipo de cáncer y su correcta interpretación, para conocer mejor la enfermedad y la respuesta de cada paciente a su propia enfermedad

En este trabajo, los factores pronósticos se han dividido en grupos.

FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS RELACIONADOS CON LA CLÍNICA:

- Estadío clínico

Probablemente es el factor pronóstico más significativo, tanto para la supervivencia como para la progresión de la enfermedad.

Se distribuyen las pacientes en grupos según la clasificación FIGO. En esta clasificación existen cuatro estadios principales con subgrupos y cada uno de ellos tiene diferente tasa de supervivencia y progresión. Los estadios altos tienen mayor probabilidad de metástasis ganglionares.

- Estado general del paciente

El estado general del paciente, medido con la escala ECOG, tiene significación estadística en el estudio de la supervivencia global, progresión de la enfermedad y fracaso local.

La escala ECOG es una forma de medir la calidad de vida de un paciente oncológico, cuyas expectativas de vida cambian en el transcurso de tiempos muy cortos. Fue diseñada por el Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de Estados Unidos y validada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1982.

Esta escala, valora las capacidades de independencia del paciente para la realización de tareas cotidianas. La escala ECOG se puntúa de 0 a 5:

Tabla 8.- Representación de la escala ECOG.

ECOG 0	El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
ECOG 1	El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
ECOG 2	El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.
ECOG 3	El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como por ejemplo el vestirse.
ECOG 4	El paciente permanece encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria, como por ejemplo la higiene corporal, la movilización en la cama e incluso la alimentación.
ECOG 5	Fallecido.

La calidad de vida del paciente es muy importante para plantear un tratamiento, de su estado dependerá el protocolo terapéutico y el pronóstico de la enfermedad.

FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS RELACIONADOS CON EL TUMOR:

- Tamaño tumoral.

El tamaño tumoral es una medida por técnicas de imagen.

Es un factor muy relevante en el pronóstico del paciente, de tal manera, que motivó la revisión de la clasificación hecha por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en 1995. Se hizo una subdivisión de estadio IB en función de esta variable, tanto por la mayor incidencia de metástasis ganglionares como por la menor supervivencia.

Los tumores se agrupan en menor o igual a 4 cm (grupo IB1), o mayores de 4 cm (grupo IB2). En gran cantidad de trabajos el tamaño tumoral está asociado de forma significativa con la supervivencia.

- Histopatología y grado de diferenciación tumoral.

El tipo de tumor, principalmente carcinoma epidermoide y adenocarcinoma, ha sido un factor pronóstico muy controvertido. Clásicamente se ha considerado que el adenocarcinoma tiene un peor pronóstico que el carcinoma escamoso, pero actualmente varios estudios no han mostrado diferencias pronósticas entre ellos.

El grado de diferenciación tumoral, también ha sido tenido en cuenta como factor pronóstico, pero es necesario tener la pieza quirúrgica o una biopsia de gran tamaño para poder definir el grado adecuadamente.

- Afectación ganglionar.

El estado de afectación de los ganglios linfáticos tiene gran importancia en la progresión de la enfermedad y en la supervivencia. En función de los

ganglios afectados y su localización, el pronóstico puede variar considerablemente.

Pueden estar afectados los ganglios parametriales, asociados o no a la afectación de los ganglios pélvicos, y los ganglios paraaórticos, cada tipo con un impacto diferente en la supervivencia.

El número de ganglios afectados también afectaba al pronóstico de las pacientes.

Factores moleculares:

Con el avance de la ciencia y después de años de investigación, van apareciendo genes y proteínas directamente implicados en el crecimiento tumoral y su evolución.

Se buscan alteraciones o diferencias que nos permitan aportar información útil para poder hacer una medicina más personalizada y evite que dos pacientes con similares tumores y tratamiento evolucionen de forma completamente diferente.

Algunas de estas proteínas, como el EGFR, o Her-2 se utilizan ya como marcadores para nuevas terapias con buenos resultados y otras muchas se encuentran aún en estudio.

Aquí podríamos encuadrar las proteínas que se estudian en este trabajo.

- Ki67

La proliferación tumoral es un factor importante que debemos conocer en el crecimiento tumoral. Este factor influye en el comportamiento de la neoplasia, por lo que su valoración aporta al clínico información de pronóstico y de respuesta al tratamiento.

La medición de la proliferación con ki67 puede tener según algunos autores significado pronóstico para la supervivencia del paciente.

- P53

La proteína p53 es un importante regulador del ciclo celular.

Esta proteína esta mutada en más del 50% de los tumores de cualquier localización, sin embargo no ocurre así en el cáncer de cérvix, donde es muy rara la mutación. Pero en el cérvix es muy alta la probabilidad de infección por el virus HPV, que en su ciclo biológico inactiva p53.

P53 es una proteína interesante de estudiar por las consecuencias que conlleva su inactivación.

- CD34

La neo- vascularización permite a los tumores crecer y expandirse ya que los nuevos vasos le harán llegar nutrientes y oxígeno a las zonas más alejadas.

Con el marcaje de la proteína CD34, podemos realizar un conteo de los nuevos vasos, ya que su morfología es diferente a la de los vasos existentes.

- P21waf

P21waf es la proteína efectora de la detención del ciclo celular ante cualquier daño en el DNA. Actúa muy relacionada con p53, y también es afectada por la infección de las células por HPV.

Su inactivación provocaría la proliferación descontrolada sin reparación del daño sufrido por el DNA.

OBJETIVOS

HIPOTESIS DE TRABAJO

Los factores clínicos (FIGO, ECOG, tamaño tumoral, tipo de tumor y afectación ganglionar) no consiguen discriminar suficientemente la evolución de las pacientes con carcinoma avanzado de cérvix, por lo que se ha diseñado un estudio en el que se valora si la expresión de p53, Ki67, CD34 y p21^{waf} pueden ayudar a identificar pacientes con diferente evolución.

OBJETIVOS

- 1.-Evaluar la expresión de las proteínas p53, p21^{waf}, Ki67 y CD34 en las muestras de carcinomas avanzados de cérvix y determinar su impacto pronóstico en términos de supervivencia global, supervivencia libre de progresión y supervivencia libre de fracaso local.
- 2.-Determinar si existe una posible relación entre la expresión de las proteínas p53, p21^{waf}, Ki67 y CD34 entre sí, en las muestras de carcinoma avanzado de cérvix.
- 3.- Correlacionar la expresión de las proteínas analizadas con las variables clínico – patológicas descritas: el estado del paciente (ECOG), el estadio FIGO, El tipo tumoral, el tamaño tumoral y la afectación ganglionar, en las pacientes con carcinoma avanzado de cérvix.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.-SELECCIÓN DE CASOS

Este estudio reúne un total de 186 casos de pacientes tratadas por el servicio de Radioterapia del Hospital Universitario 12 de Octubre. Todas las muestras de estas pacientes proceden del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Las pacientes fueron diagnosticadas entre los años 1994-2007.

Criterios de inclusión de las pacientes en este estudio:

- Todas las pacientes habían sido diagnosticadas de carcinoma avanzado de cérvix.
- Ninguna de ellas había sido tratada con cirugía.
- Todas habían sido tratadas con radioterapia y quimioterapia concomitante.
- Disponibilidad del bloque de la biopsia con suficiente material para poder realizar las pruebas sin agotarle.

Se seleccionaron 186 muestras, de las que 155 fueron carcinomas epidermoide (83,33%), 30 adenocarcinomas (16,33%) y 1 carcinoma adenoescamoso (0,54%).

2.-DATOS CLÍNICOS

Variables recogidas en la base de datos:

- Edad de las pacientes (años)
- ECOG (estado general de la paciente)
- Estadio clínico según FIGO (I, IA, IB, II, IIA, IIB, III, IIIA, IIIB, IV, IVA, IVB)
- Tamaño tumoral (mayor o menor de 6 cm)
- Tipo histopatológico (Escamoso, Adenocarcinoma, Adenoescamoso)
- Afectación ganglionar (1 si, 2 no) (Pélvicos o paraaorticos)

3.-ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO

Para el estudio histopatológico, todas las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% aproximadamente 16 horas (según el tamaño de la muestra), deshidratadas con alcoholes crecientes (alcohol de 70º,95º,100º, tolueno) hasta su inclusión en parafina.

Después de este proceso, se elaboran los bloques de parafina y una vez endurecidos se realizan con el microtomo secciones tisulares de 3 micras y son colocadas sobre portaobjetos xilanizados.

Se cortan las suficientes laminillas para realizar una tinción de Hematoxilina-Eosina y cortes sin teñir para la posterior realización de las técnicas inmunohistoquímicas.

Se mantienen los cortes toda la noche en estufa a 56ºC.

La tinción de hematoxilina - eosina se realiza como control, por una parte para comprobar la existencia de suficiente material en el bloque de parafina, y por otra para confirmar el diagnóstico. En este caso cabría destacar que al ser pacientes no operadas, no contábamos con la pieza tumoral, sino con biopsias pequeñas, lo que dificultaba en muchos casos determinar el grado de diferenciación histopatológica, por lo que no incluimos este factor en este estudio.

4.-ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUIMICO

Para la realización de la técnica inmunohistoquímica, una vez obtenidos los cortes en cristales xilanizados y estufados, se utilizó el inmunoteñidor Bond III de Leica, con su sistema de visualización Leica Bond Polymer Refine Kit.

- Tinción Inmunohistoquímica

- 1- Desparafinado con xilol e hidratación con alcoholes decrecientes (alcohol de 100º, 96º,70º) hasta el agua.
- 2- Recuperación antigénica con calor, utilizando como solución recuperadora tampón citrato pH6, o bien EDTA pH8, dependiendo del

marcador que estemos estudiando. También varía el tiempo de recuperación.

- 3- Lavado con tampón fosfato (PBS).
- 4- Incubación con Bloqueante de Peroxidasa (para inhibición de la peroxidasa endógena)
- 5- Lavado con PBS.
- 6- Incubación con suero no inmune (para evitar las uniones inespecíficas).
- 7- Incubación con el anticuerpo primario.(presentados en la tabla XXX
- 8- Lavado con PBS.
- 9- Incubación con el polímero marcado con peroxidasa.
- 10-Lavado con PBS.
- 11-Incubación con 3,3-diaminobencidina (cromógeno).
- 12-Lavado con agua destilada.
- 13-Contratinción con Hematoxilina.
- 14-Deshidratación con alcoholes crecientes (alcohol de 70º,95º,100º) y xilol.
- 15-Montaje con DPX.

Para el estudio Inmunohistoquímico se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

✓ Inhibidores del Ciclo celular:

- P53: anticuerpo monoclonal obtenido en ratón, clon D07 de Dako, utilizado a una dilución de 1/100.
- P21 waf/cip: anticuerpo monoclonal obtenido en ratón, clon SX118 de Dako, utilizado a una dilución de 1/50.

✓ Marcador de Proliferación:

- Ki67: anticuerpo monoclonal obtenido en ratón, clon Mib1 de Dako, utilizado a una dilución de 1/100.

✓ Marcador de Angiogénesis-Densidad Microvasos:

- CD34:anticuerpo monoclonal obtenido en ratón, clon QBEnd/10 de Leica, utilizado a una dilución de 1/100

Tabla 8b.-Características de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpos primarios	Clón	Dilución	Laboratorio	Pretratamiento	Marcaje
p53	DO7	1/100	Dako	pH8	Núcleo
p21Waf/cip	SX118	1/100	Dako	pH6	Núcleo
CD34	QBEnd/10	1/50	Leica	pH6	Citoplasma
Ki67	Mib1	1/100	Dako	pH8	Núcleo

5.-EVALUACION DE LA TINCION INMUNOHISTOQUIMICA

Se evaluaron la intensidad y el porcentaje de células positivas en las muestras. Para el análisis estadístico y para poder mantener la reproductividad del estudio, se utilizaron puntos de corte claros y perfectamente definidos para cada una de las proteínas estudiadas.

Para la valoración de P53, se consideró positiva toda tinción nuclear en más del 10% de las células tumorales. En el caso de p21waf se consideró positiva una tinción nuclear, superior al 20% de las células tumorales marcadas. Para la proteína ki67 se consideró positiva la tinción nuclear pero se distribuyeron en tres grupos con valores menores del 40%, mayores de 40 y menores del 70% y mayores del 70%. Se evaluó el porcentaje de células positivas en cada caso.

Para la valoración de CD34 cualquier célula endotelial teñida o un grupo de células endoteliales, con o sin luz, claramente separada de células tumorales y de otros elementos tisulares conectivos, será considerada un microvaso. Se deben excluir áreas tumorales de necrosis y hemorragia, así como vasos dilatados o vasos con densas capas musculares.⁷⁶

Para el conteo de los microvasos las secciones fueron visualizadas al microscopio óptico a un aumento de (40X) para seleccionar las áreas de alta

densidad de microvasos (vascular hot spots).El recuento se realizó en 10 campos obteniendo la media de los vasos de los diferentes campos.

6.-ANÁLISIS DE DATOS

- Estadística descriptiva:

Se obtuvo una descripción general de las distintas variables del análisis. El resumen de la información de las variables tratadas se presentó, para aquellas que son cualitativas o no numéricas, mediante su distribución de frecuencia absoluta y porcentaje. Las variables numéricas o cuantitativas se describieron mediante sus medidas de tendencia central, media o mediana, acompañadas de las medidas de dispersión, desviación estándar o rango intercuartílico.

- Estadística analítica:

- Tabla de supervivencia:

Describimos el tiempo hasta el evento desarrollando las curvas de supervivencia mediante el método Kaplan-Meier. Obtuvimos la función de probabilidad de supervivencia. Se presentan las probabilidades de supervivencia sucedida a los 3 y 5 años junto con su intervalo de confianza al 95%.

- Tablas de supervivencia estratificadas:

Se valoró la relación entre los distintos factores o características de los pacientes y el tiempo hasta el evento estimándose las curvas de supervivencia mediante el método Kaplan-Meier, presentando en aquellos casos que fue posible la probabilidad de supervivencia sucedida a los 3 y 5 años junto con sus intervalos de confianza. La diferencia entre las distribuciones de supervivencia que aportan cada uno de los grupos que conforman un factor o una característica de la enferma se valoraron

mediante la prueba de Wilcoxon. Se acompañan los resultados con gráficos de supervivencia.

- Regresión de riesgos proporcionales de Cox:

Primero, se utilizó la técnica de regresión de riesgos proporcionales de Cox de manera univariante, siendo la variable considerada dependiente el tiempo hasta el evento. Se completó mediante un análisis multivariante usando la regresión de riesgos proporcionales de Cox. Para obtener un modelo final en el análisis multivariante se consideró tanto aquellos factores de riesgo con resultado significativo en el univariante como aquellos que tenían cierto interés o relevancia dentro del estudio. Se calculan los hazard ratio asociados para las variables independientes del modelo final, presentándose junto con sus intervalos de confianza al 95%.

RESULTADOS

Con todos los datos recopilados de las pacientes, 186 mujeres con cáncer de cérvix avanzado tratadas solo con radioterapia y quimioterapia concomitante, se realizó el estudio estadístico.

Todas las variables fueron estudiadas en el tiempo, la supervivencia global (SG), la progresión (P) y el fracaso local (FL). Los resultados presentados aquí son los valores a los 3 y 5 años.

Se realizó un análisis univariante de todas las variables que estudiamos. Por una parte

- las variables clínicas e histológicas:

Edad, ECOG, tipo de tumor, estadio FIGO, tamaño tumoral, afectación de los ganglios, hidronefrosis, tratamiento con braquiterapia y prescripción.

- la expresión de las proteínas estudiadas:

Proliferación: Ki67

Inhibidores del ciclo celular: p53, p21^{waf/cip}

Angiogénesis: CD34

A continuación se realizó el análisis multivariante, viendo la relación de cada variable con las demás.

1.-ANÁLISIS DESCRIPTIVO

En la tabla se encuentra reflejado el análisis descriptivo de las pacientes / muestras, las diferentes variables estudiadas, el número de pacientes de cada grupo y el porcentaje que representan en el total de la muestra (186 pacientes).

Tabla 9.-Análisis descriptivo de las pacientes.

VARIABLE	N	%
EDAD (media, años)	51 (rango 25-85)	
EDAD por estratos		
<40	32	17,2
40 – 50	53	28,49
51 – 60	47	25,27
61 -70	28	15,05
71 – 85	26	13,98
ECOG		
ECOG 1	10	5,38
ECOG 2	147	79,03
ECOG 3	25	13,44
ECOG 4	4	2,15
ECOG Agrupado		
ECOG 0-1	156	83,87
ECOG 2-3	30	16,13
ESTADIO FIGO		
IB1	4	2,15
IB2	29	15,59
IIA	6	3,23
IIB	67	36,02
IIIA	1	0,54
IIIB	69	37,1
IVA	10	5,38
FIGO Agrupado		
IB1 –IIB	106	56,99
IIIA-IVA	80	43,01
HISTOPATOLOGIA		
Carcinoma Epidermoide	155	83,33
Adenocarcinoma	30	16,13
Ca. Adenoescamoso	1	0,54
TAMAÑO TUMORAL		
≤ 6 CM	82	44,09
> 6 CM	104	55,91
GANGLIOS POR IMAGEN		
Pélvicos	68	36,56
Paraaorticos	32	17,2
Negativos	86	46,24

GANGLIOS AGRUPADOS		
Negativos	86	46,24
Positivos	100	53,76
HIDRONEFROSIS		
SIN Hidronefrosis	160	86,02
CON Hidronefrosis	26	13,98
DIAGNOSTICO-CIRUGIA		
Sin cirugía por mal estado	1	0,54
No indicación	146	78,49
Conización	6	3,23
Linfadenectomía paraaórtica	33	17,74
Estadía-Pruebas diagnósticas		
Escáner/Resonancia Magnética	87	46,77
PET(Tomografía por Emisión de Positrones)	67	36,02
Linfadenectomía paraaórtica	7	3,76
Línea + PET	25	13,44
BRAQUITERAPIA		
SIN Braquiterapia	8	4,3
Con Braquiterapia LDR	51	27,42
Con Braquiterapia HDR	127	68,28
PRESCRIPCION		
Puntos A y B, rectal y vesical	4	2,22
Punto A con escáner	84	46,67
Al volumen con CT escáner	63	35
Al volumen con CT escáner	29	16,11
PRESCRIPCION AGRUPADA		
Prescripción por puntos	88	48,89
Prescripción por volumen	92	51,11
FIGO: Federation International Gynecology Oncology.		
ECOG:Eastern Cooperative Oncology Group		

- **EDAD**

Se disponía de una serie de 186 pacientes, con edades comprendidas entre 25 y 85 años, con una media de 51 años.

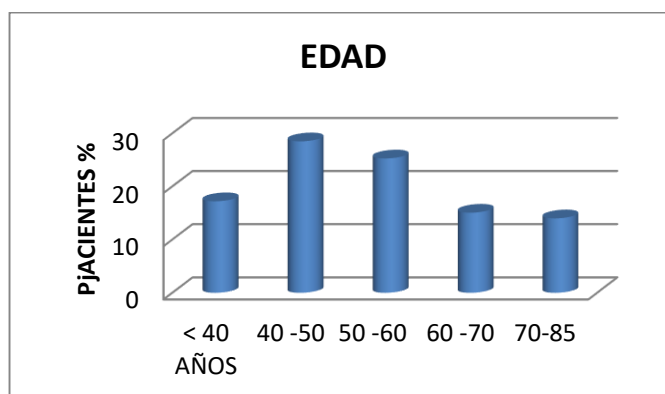
32(17,2%) de las pacientes tenían menos de 40 años, 53(28,49%) pacientes entre 40 y 50 años, otras 47 mujeres tenían una edad entre 51 y 60

años (25,27%), 28(15,05%) entre 61 y 70 años y 26(13,98%) entre 71 y 85 años.

Tabla 10.- Distribución de las pacientes por la edad.

EDAD	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
< 40 AÑOS	32	17,2
40 -50	53	28,49
50 -60	47	25,27
60 -70	28	15,05
70-85	26	13,98

Figura 28.- Distribución de las pacientes por edades.



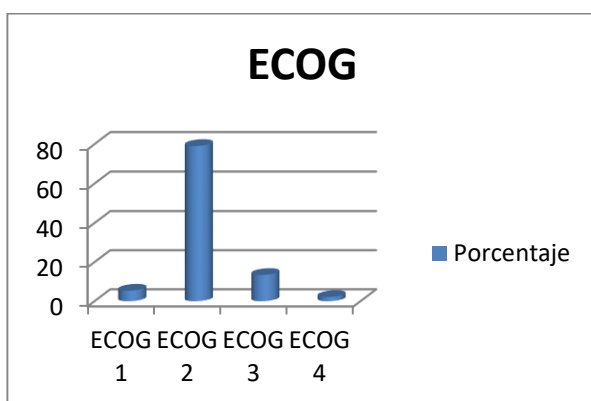
- ECOG

Los valores de ECOG para esta población quedaron distribuidos de la siguiente manera:

Tabla 11.-Distribución de las pacientes por el grado de ECOG.

ECOG	Pacientes(n)	Porcentaje (%)
ECOG 1	10	5,38
ECOG 2	147	79,03
ECOG 3	25	13,44
ECOG 4	4	2,15

Figura 29.-Distribución de las pacientes por el grado de ECOG.



Para estudiar el ECOG se separó a las pacientes en dos grupos:

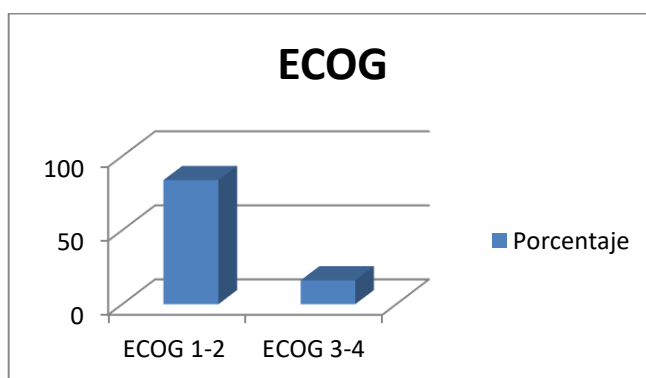
ECOG 1: agrupaba a un 83,87 % de las pacientes (ECOG 1-2), las que tenían un mejor estado general.

ECOG 2: contenía las pacientes con una peor calidad de vida (ECOG3-4), un 16,13 % del total.

Tabla 12.-Distribución de las pacientes por el grado de ECOG agrupado.

ECOG AGRUPADO	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
ECOG 1-2	156	83,87
ECOG 3-4	30	16,13

Figura 30.-Distribución de las pacientes por el grado de ECOG agrupado.



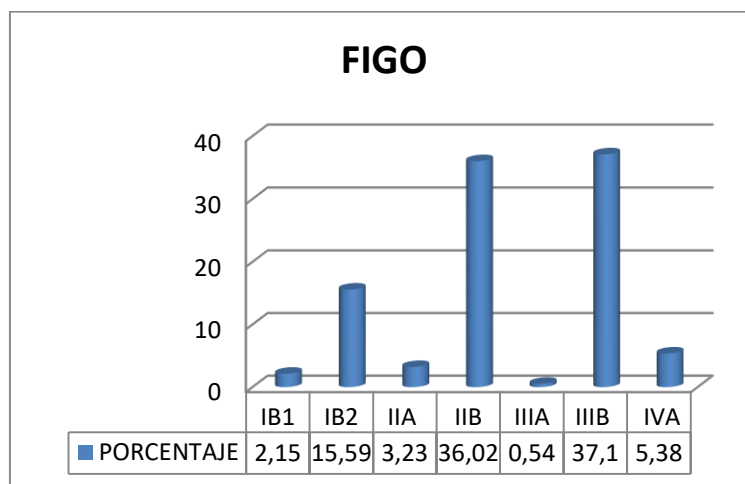
- Estadío FIGO

De las pacientes estudiadas, 2,15% (4/186) se encontraban en el estadío IB1, 15,59% (29/186) en el estadío IB2, 3,23% (6/186) en el estadío IIA, 36,02% (67/186) en el estadío IIB, 0,54%(1/186) en el IIIA, 37,1% (69/186) en el IIIB y el 5,38% (10/186) en el estadío IVA.

Tabla 13.-Distribución de las pacientes por el estadío FIGO.

FIGO	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
IB1	4	2,15
IB2	29	15,59
IIA	6	3,23
IIB	67	36,02
IIIA	1	0,54
IIIB	69	37,1
IVA	10	5,38

Figura 31.-Distribución de la población por el estadío FIGO.

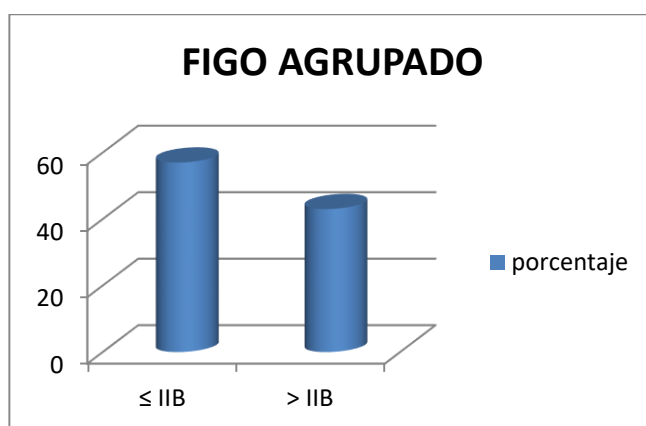


Se hizo un reagrupamiento de pacientes: En un grupo, todas las pacientes que tenían un estadío FIGO menor o igual que el estadío IIB (106 pacientes que representan el 56,99 % del total), y en el otro las pacientes con un estadío mayor de IIB (80 pacientes que representaban el 43,01% de las 186 pacientes).

Tabla 14.- Distribución de las pacientes por el estadio FIGO agrupado.

FIGO AGRUPADO	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
≤ IIB	106	56.99
>IIB	80	43.01

Figura 32.-Distribución de las pacientes por el estadio FIGO agrupado.



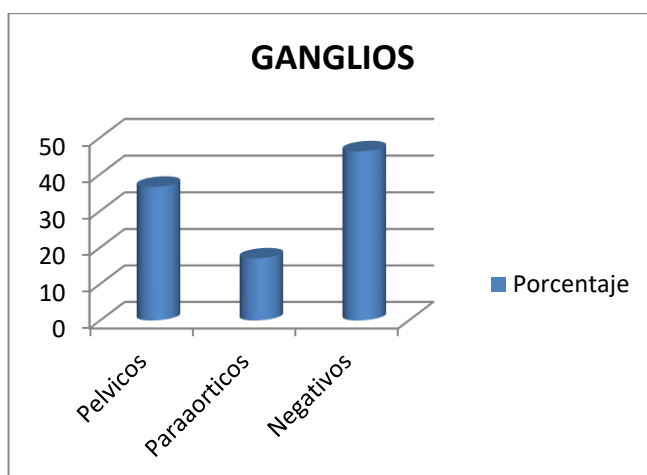
- GANGLIOS**

Para estudiar la afectación ganglionar se distribuyó a la población en tres grupos: uno con ganglios negativos (46,24% ,86/186) otro grupo de pacientes con afectación solo de los ganglios pélvicos (36,56%, 68/186), y otro grupo con afectación de los ganglios paraaórticos (17,02%, 32/186) aunque las pacientes que tenían estos ganglios afectados, en general solían tener positivos también los pélvicos.

Tabla 15.-Distribución de las pacientes por la afectación ganglionar.

GANGLIOS	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
Pélvicos	68	36,56
Paraaórticos	32	17,02
Negativos	86	46,24

Figura 33.-Distribución de las pacientes por la afectación ganglionar.

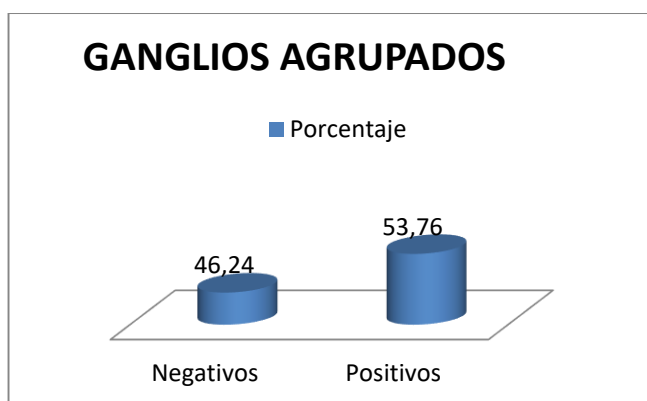


Para este estudio también se consideraron los valores de los ganglios agrupados en positivos (53,76%) y negativos (46,24%), independientemente de la zona de invasión.

Tabla 16.- Distribución de las pacientes por la afectación ganglionar agrupada.

GANGLIOS	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
Negativos	86	46,24
Positivos	100	53,76

Figura 34.-Distribución de las pacientes por la afectación ganglionar agrupada



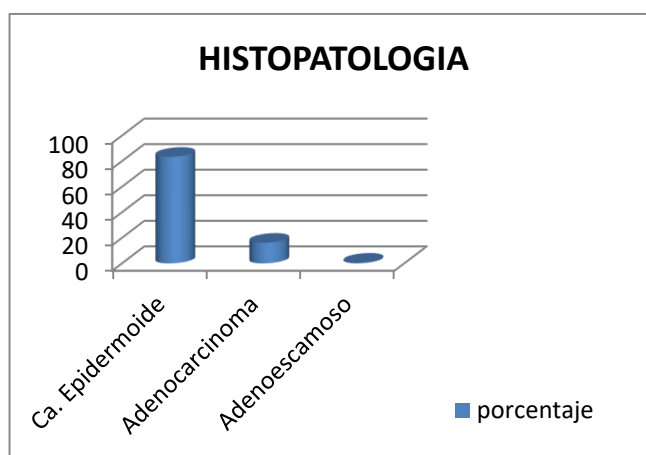
- HISTOPATOLOGIA

En relación con el tipo tumoral, aunque fue claramente mayoritario el carcinoma epidermoide, con el 83,33% (155/186) de los casos, se encuentra también 30 pacientes con adenocarcinoma (16,13%, 30/186) y 1 con carcinoma adenoescamoso (1/186, 0,54%).

Tabla 17.- Distribución de las pacientes por el tipo tumoral.

HISTOPATOLOGIA	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
Ca. Epidermoide	155	83,33
Adenocarcinoma	30	16,13
Ca. Adenoescamoso	1	0,54

Figura 35.-Distribución de las pacientes por el tipo tumoral.



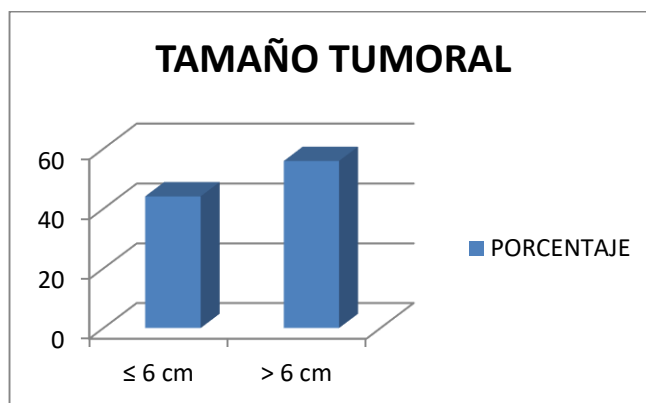
- TAMAÑO TUMORAL

Para su estudio, las pacientes se separaron en dos grupos según el tamaño del tumor fuera mayor o menor de 6 cm. El 44,09% de las pacientes (82/186) tenían un tumor menor o igual de 6 cm, y un 55,91 % (104/186) tenían un tumor mayor de este valor.

Tabla 18.-Distribución de las pacientes por el tamaño tumoral.

TAMAÑO TUMORAL	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
≤ 6 cm	82	44,09
> 6 cm	104	55,91

Figura 36.- Distribución de las pacientes por el tamaño tumoral.



- **DIAGNOSTICO – CIRUGIA**

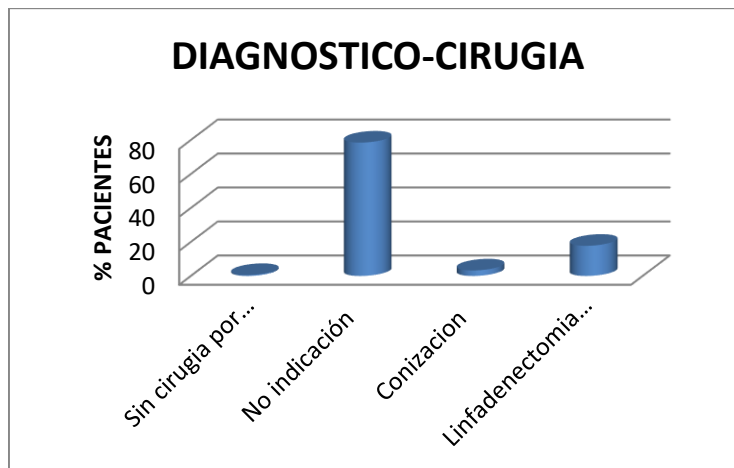
La población de pacientes de este estudio fueron mujeres con carcinoma de cérvix avanzado tratadas con radioterapia, sin eliminación del tumor por cirugía.

En este punto se agrupó a las pacientes: sin cirugía, no indicada, con conización, o linfadenectomía. Estas técnicas fueron utilizadas para el diagnóstico.

Tabla 19.-Distribución de las pacientes por la indicación de cirugía para el diagnóstico.

DIAGNOSTICO – CIRUGIA	Pacientes	Porcentaje
Sin cirugía por mal estado	1	0,54
No indicación	146	78,49
Conización	6	3,23
Linfadenectomía paraaórtica	33	17,74

Figura 37.- Distribución de las pacientes por la indicación de cirugía.



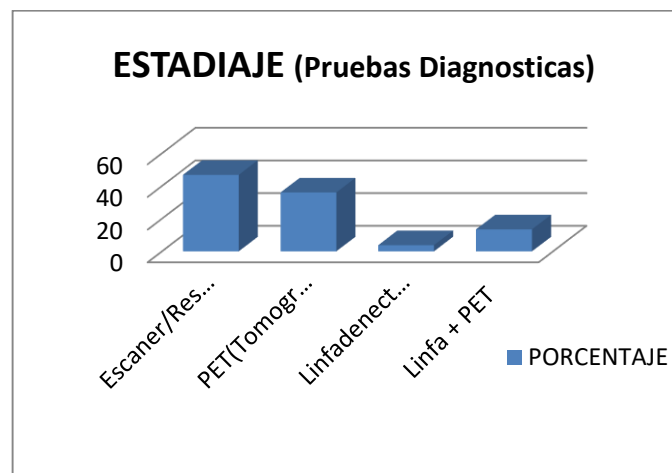
- ESTADIAJE – PRUEBAS DIAGNOSTICAS

En este apartado se agruparon las pacientes según las pruebas diagnósticas que se emplearon para establecer el estadiaje de su enfermedad.

Tabla 20.-Distribución de las pacientes por la indicación de cirugía para el diagnóstico.

ESTADIAJE-Pruebas diagnósticas	Pacientes	Porcentaje
Escáner/Resonancia Magnética	87	46,77
PET (Tomografía por Emisión de Positrones)	67	36,02
Linfadenectomia paraaórtica	7	3,76
Linfa + PET	25	13,44

Figura 38.- Distribución de las pacientes por pruebas realizadas para el diagnóstico.



- **BRAQUITERAPIA**

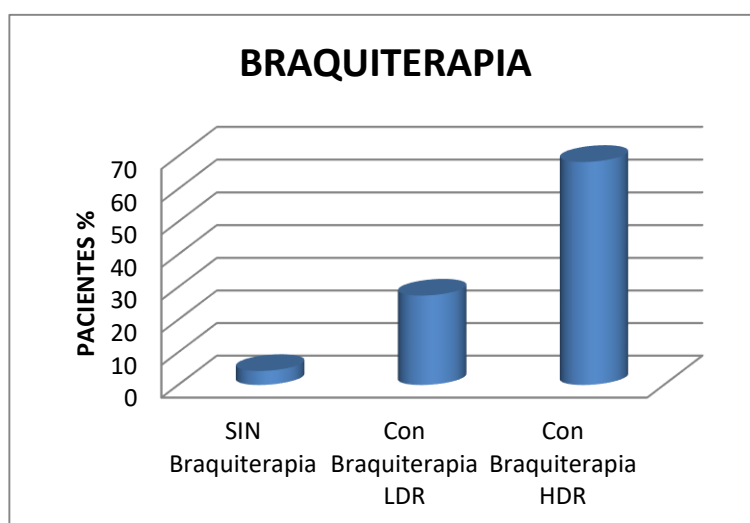
La mayor parte de las pacientes fueron tratadas con radiación interna, además de la radioterapia externa.

En este caso las pacientes fueron distribuidas en tres grupos: SIN Braquiterapia (4,30%), Braquiterapia con baja tasa de dosis (BQT LDR) utilizada en el 27,42% de las pacientes, y la Braquiterapia de alta dosis (BQT HDR) aplicada en el 68,28% de las pacientes.

Tabla 21.-Distribución de las pacientes por la braquiterapia aplicada.

BRAQUITERAPIA	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
SIN Braquiterapia	8	4,3
Con Braquiterapia LDR	51	27,42
Con Braquiterapia HDR	127	68,28

Figura 39.- Distribución de las pacientes por la braquiterapia aplicada.



- **PRESCRIPCION**

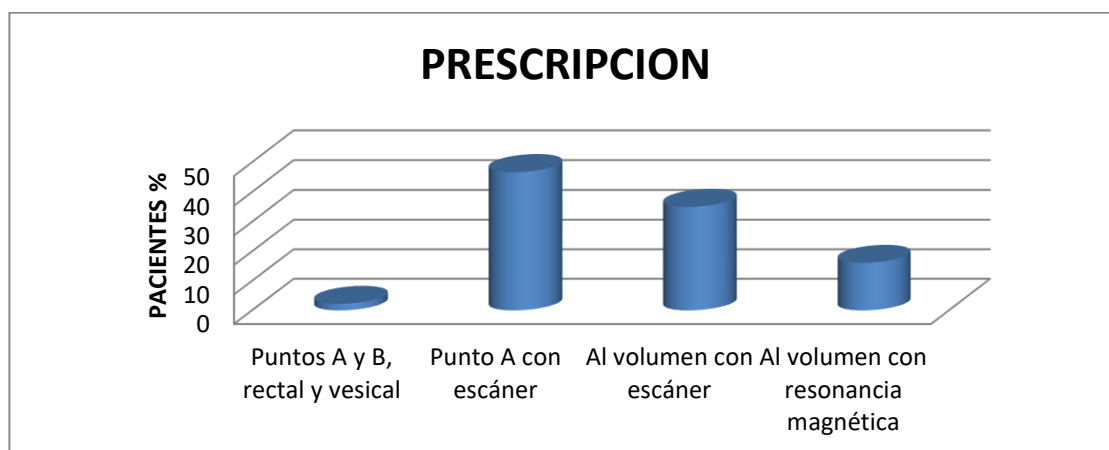
La aplicación de la radiación por diferentes parámetros.

Para el estudio de la prescripción las pacientes se distribuían en cuatro grupos:

Tabla 22.-Distribución de las pacientes por la prescripción aplicada.

PRESCRIPCION	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
Puntos A y B, rectal y vesical	4	2,22
Punto A con escáner	84	46,67
Al volumen con escáner	63	35
Al volumen con resonancia	29	16,11

Figura 40.- Distribución de las pacientes por la prescripción aplicada.

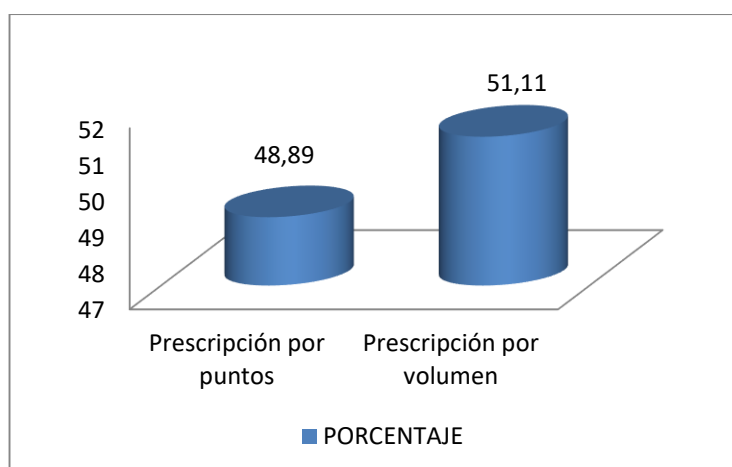


También se ha agrupó la prescripción en dos bloques:

Tabla 23.-Distribución de las pacientes por la prescripción aplicada.

PRESCRIPCION	Pacientes (n)	Porcentaje (%)
Prescripción por puntos	88	48,89
Prescripción por volumen	92	51,11

Figura 41.-Distribución de las pacientes por la prescripción aplicada.



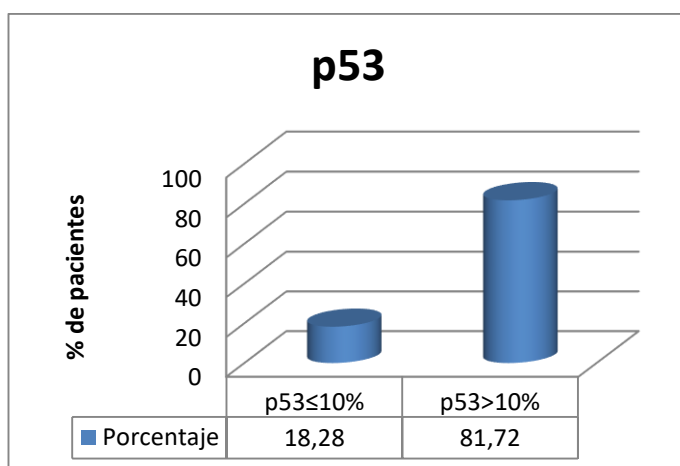
Expresión de las proteínas estudiadas

Tabla 24.-Expresión de las proteínas estudiadas

VARIABLE	N	%
p53		
p53 \leq 10%	34	18,28
p53 $>$ 10%	152	81,72
p21 waf		
p21 \leq 20%	34	18,28
p21 $>$ 20%	152	81,72
ki67		
ki67 $<$ 40%	12	6,45
40 – 70%	75	40,32
ki67 $>$ 70%	99	53,23
CD34		
CD34 \leq 15 vasos	67	36,02
CD34 $>$ 15 vasos	119	63,98

- P53

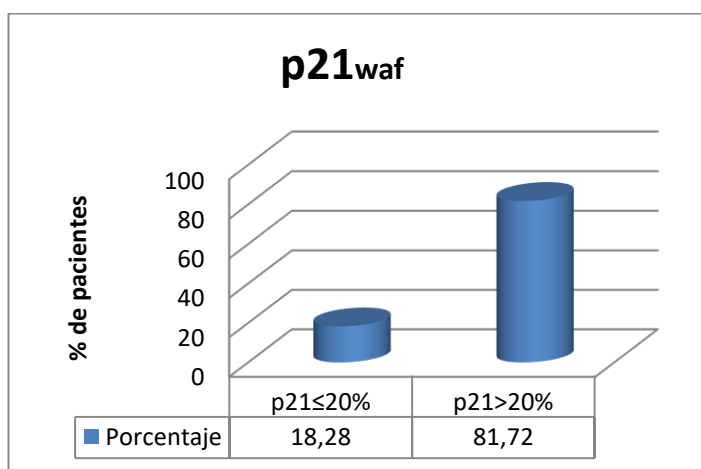
Figura 42.-Porcentaje de la población y sus valores de expresión de p53.



34 de 186 pacientes, un 18,28% de la población mostraba unos valores de expresión de la proteína p53 menores del 10% de las células tumorales y 152 de 186 (81,72%) pacientes mostraban cifras por encima de este valor.

- P21_{waf/cip}

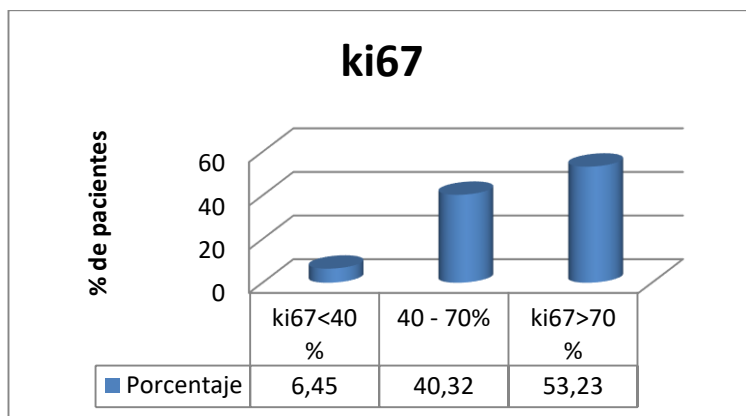
Figura 43.- Porcentaje de pacientes y valores de expresión de p21waf.



Valores de expresión de p21waf menores del 20% de las células tumorales, se encontraron en el 18,28% (34/186) de la población, mientras que el 81,72%(152/186) tenían cifras por encima de ese valor.

- Ki67

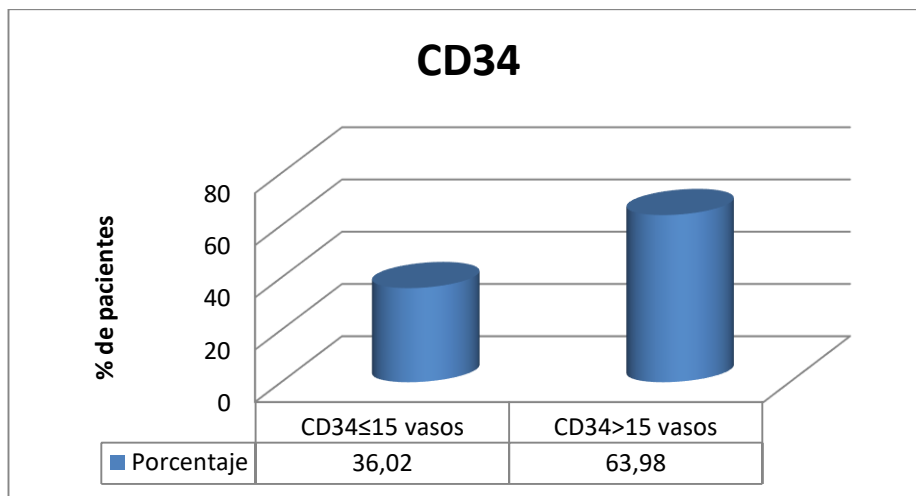
Figura 44.- Porcentaje de pacientes y valores de expresión de Ki67.



Los valores de expresión de ki67 menores del 40% de las células tumorales afectaban al 6,45%(12/186) de las pacientes, entre el 40 y 70% de expresión al 40,32%(75/186) y valores de expresión de ki67 por encima del 70% de las células tumorales pudimos encontrarlos en el 53,23%(99/186) de esta población.

- CD34

Figura 45.- Porcentaje de pacientes y valores de expresión de CD34.



Hay 67 de 186 pacientes, el 36,02% de la población, que muestran 15 o menos nuevos vasos contabilizados por la expresión de CD34, mientras que 119 de 186, el 63,98% de la población muestra un número de nuevos vasos mayor de 15.

2.-SUPERVIVENCIA GLOBAL

VARIABLE	Supervivencia Global		
	SG a los 5 años	Intervalo de confianza 95%	P valor
ECOG			
ECOG 1	1,00	...	0,0002*
ECOG 2	0,80	0,72 – 0,85	
ECOG 3	0,50	0,29 – 0,68	
ECOG 4	0,50	0,05 – 0,84	
ECOG AGRUPADOS			
ECOG 1-2	0,81	0,73 – 0,86	0,0001*
ECOG 3-4	0,51	0,32 – 0,68	
HISTOPATOLOGIA			
Carcinoma	0,76	0,68 – 0,82	0,77
Adenocarcinoma	0,76	0,53 – 0,88	
Adenoescamoso	1,00	..	
ESTADIO FIGO			
IB1	0,75	0,12 – 0,96	0,04*
IB2	0,74	0,51 – 0,88	
IIA	1,00	...	
IIB	0,87	0,76 – 0,93	
IIIA	
IIIB	0,68	0,56 – 0,78	
IVA	0,54	0,18 – 0,80	
FIGO Agrupado			
IB1 –IIB	0,84	0,75 – 0,90	0,002*
IIIA-IVA	0,66	0,54 – 0,75	
TAMAÑO TUMORAL			
<= 6 CM	0,84	0,72 – 0,91	0,02*
> 6 CM	0,70	0,72 – 0,91	
GANGLIOS POR			
Pélvicos	0,80	0,68 – 0,88	0,08*
Paraaorticos	0,61	0,41 – 0,76	
Negativos	0,79	0,68 – 0,86	
GANGLIOS			
Negativos	0,79	0,68 – 0,86	0,35
Positivos	0,74	0,64 – 0,81	
p53			
p53 <10	0,74	0,54 – 0,86	0,84
p53 >10	0,77	0,69 – 0,83	
p21			
p21 <20	0,82	0,61 – 0,92	0,27
p21 >20	0,74	0,66 - 0,81	
ki67			
ki67 < 40	0,44	0,14 – 0,70	0,01*
ki67 >40 >70	0,77	0,65 – 0,85	
ki67 >70	0,79	0,70 – 0,86	
CD34			
CD34 <15	0,75	0,63 – 0,84	0,86
CD34 >15	0,76	0,76	

Tabla 25.- Representación de las probabilidades de supervivencia global a los 5 años junto con su intervalo de confianza del 95% y el valor de *p* según la estimación de Kaplan-Meier *Valores estadísticos significativos. * Límite de significación

La supervivencia global a los 5 años fue del 76,46%, de las 186 pacientes habían fallecido 41.

La supervivencia global a los 3 años fue del 79,36%

En este estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global con: el tipo histológico, los factores reguladores del ciclo celular (proteína p53, proteína p21) y microvasos (CD34).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en: ECOG, FIGO, tamaño tumoral, afectación ganglionar y fracción.

A continuación se expresa la magnitud del efecto, estimada por el hazard ratio (modelo de riesgo proporcional de Cox) de aquellas variables con valores estadísticamente significativos para la supervivencia global a los 5 años.

- ECOG

Para su mejor estudio se reagrupan los pacientes:

ECOG 1-2

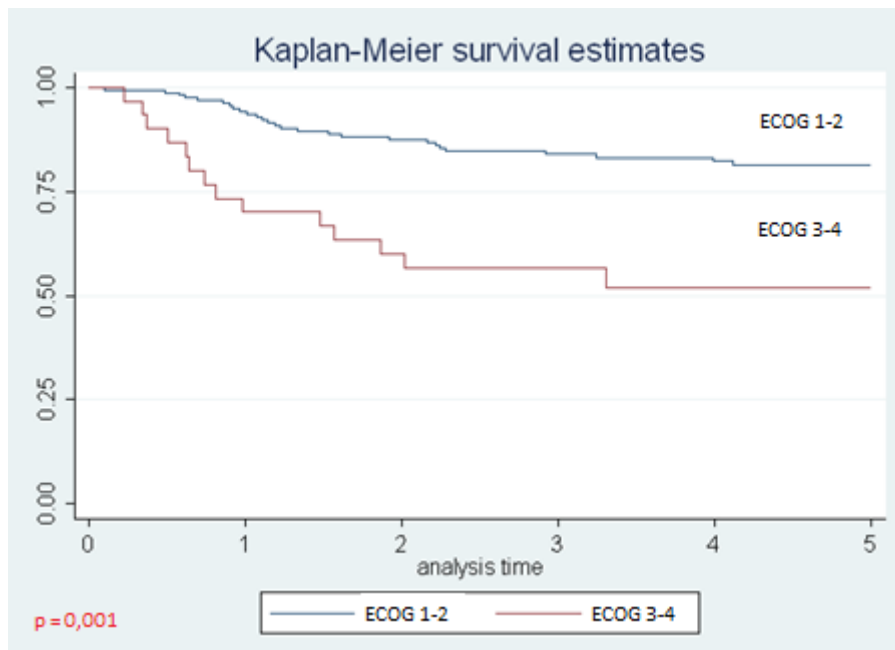
ECOG 3-4

La supervivencia global estimada a los 3 años fue del 83,89% para el ECOG 1-2 y del 56,67% para el ECOG 3-4. A los 5 años la supervivencia global estimada fue del 81,30% para el grupo ECOG 1-2 y del 51,94% para el grupo de ECOG 3-4.

Tabla 26.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de ECOG.

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
ECOG AGRUPADOS		
ECOG 1-2	83,89%	81,30%
ECOG 3-4	56,67%	51,94%

Figura 46.- Función de supervivencia global a los 5 años de los dos grupos de pacientes con valores de ECOG 1-2 y 3-4.



Cuando el p valor de la Chi cuadrado fue significativo, hicimos la regresión de Cox.

Regresión de Cox:

	Hazard Ratio	P> z	Intervalo de confianza
ECOG 3-4	3.46	0.00	1.81 – 6.62

La regresión de Cox comparaba las pacientes del grupo ECOG 3-4 con las del grupo ECOG 1-2, y los resultados demostraron que, las pacientes del grupo con valores de ECOG elevados tienen un riesgo de fallecimiento 3,46 veces mayor que las pacientes con valores de ECOG 1-2.

- FIGO

Para su mejor estudio se reagrupan los pacientes:

FIGO ≤ IIB: IA-IB-IIA-IIB

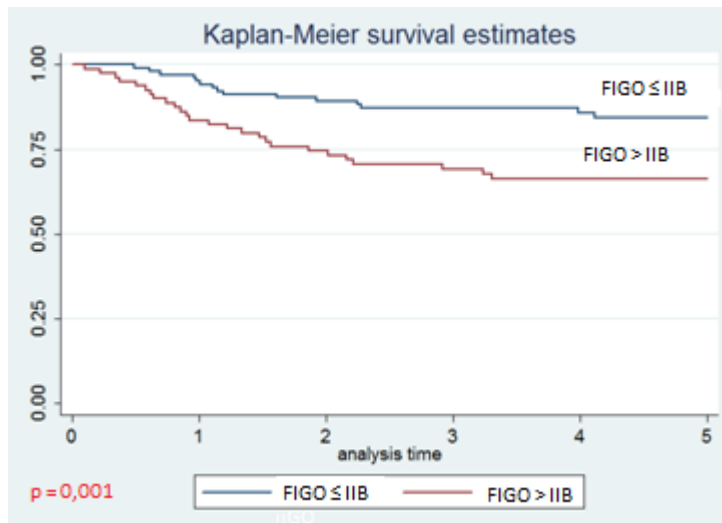
FIGO >IIB: IIIA-IIIB-IVA

La supervivencia global estimada a los 3 años fue del 87,19% para el grupo de FIGO \leq IIB y del 69,18% para el grupo de FIGO $>$ IIB. A los 5 años la supervivencia global fue del 84,35% para el grupo FIGO \leq IIB y del 66,17% para el grupo de FIGO $>$ IIB.

Tabla 27.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de FIGO.

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
FIGO Agrupado		
FIGO \leq IIB	87,19%	84,35%
FIGO $>$ IIB	69,18%	66,17%

Figura 47.- Función de supervivencia global a los 5 años de las pacientes distribuidas por los valores de FIGO.



Regresión de Cox:

	Haz. Ratio	P> z	Intervalo de confianza
FIGO $>$ IIB	2.55	0.004	1.35 – 4.82

Se comparó el grupo de pacientes cuyo FIGO es mayor de IIB con el de valores menor o igual a IIB obteniendo como resultado que, el riesgo de fallecimiento a los 5 años en las pacientes distribuidas en grupos FIGO mayores de IIB, fue 2,55 veces mayor que en las pacientes incluidas en grupos de FIGO menores de IIB.

- TAMAÑO TUMORAL

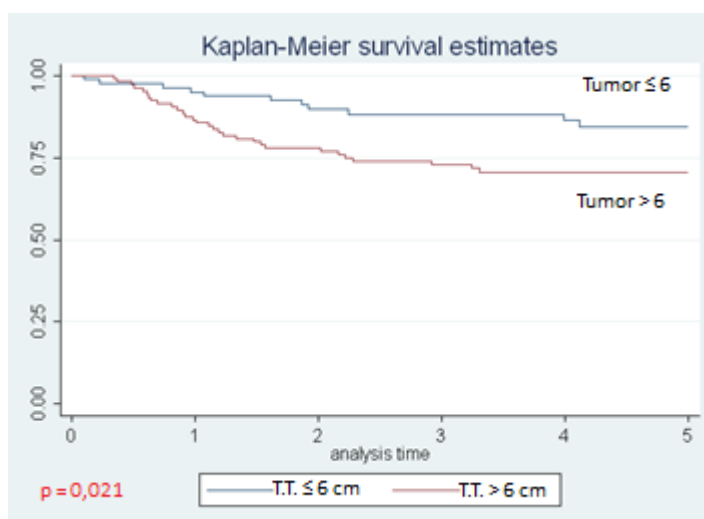
Distribución de pacientes por el tamaño tumoral: pacientes con tumores menor o igual a 6 cm y pacientes con tumores mayores de 6 cm.

La supervivencia global estimada a los 3 años fue del 88,23% para tumores menores de 6 cm y del 72,84% para los mayores de ese valor. A los 5 años la supervivencia global estimada fue del 84,21 % para los tumores menores de 6 cm y del 70,59% para los tumores mayores de 6 cm.

Tabla 28.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tamaño tumoral.

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
TAMAÑO TUMORAL		
Tumores \leq 6 cm.	88,23%	84,21%
Tumores $>$ 6 cm.	72,84%	70,59%

Figura 48.-Función de supervivencia global a los 5 años dependiendo del tamaño tumoral.



Regresión de Cox:

	Haz. Ratio	P> z	Intervalo de confianza 95%
Tamaño tumor > 6	2,20	0.025	1.10 – 4.39

Se comparó el grupo de pacientes con tumores mayores de 6cm con el grupo de pacientes con tumores menores de este valor. El resultado fue que las pacientes con tumores mayores de 6 cm tenían un incremento del riesgo de fallecimiento 2,20 veces mayor que las pacientes con tumores menores de 6 cm.

- TIPO HISTOLÓGICO

Tabla 29.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tipo histológico.

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
HISTOPATOLOGIA		
Ca. Epidermoide	77,29%	76,45%
Adenocarcinoma	89,38%	76,08%
Adenoescamoso	100%	100%

No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tipos tumorales y la supervivencia global (p=0,77)

- AFECTACION GANGLIONAR

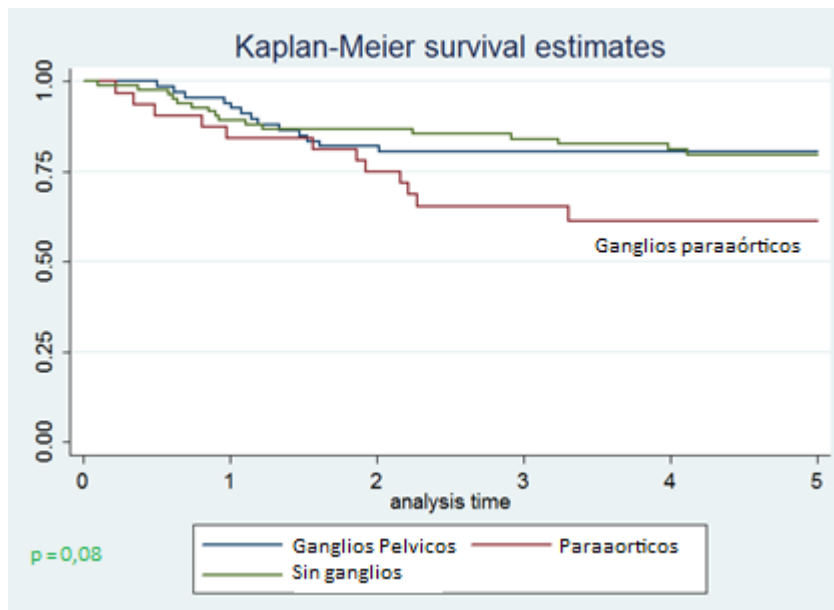
Se distribuyeron las pacientes por grupos, con afectación de ganglios pélvicos, con afectación de ganglios paraaorticos y sin afectación ganglionar.

Las supervivencias de cada grupo a los 3 y 5 años están representadas en la tabla.

Tabla 30.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la afectación ganglionar.

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
GANGLIOS		
Ganglios Pélvicos	80,49%	80,49%
Ganglios Paraaorticos	65,48%	61,38%
Ganglios negativos	84,06%	79,49%

Figura 49.-Función de supervivencia global a los 5 años dependiendo de la afectación ganglionar.



El p valor de la Chi cuadrado en el estudio de los ganglios da un valor cercano a la significación $p = 0,08$. En la función de supervivencia vimos claramente un comportamiento distinto en la supervivencia de las pacientes con ganglios paraaórticos afectados.

Regresión de Cox:

	Haz. Ratio	$P > z $	Intervalo de confianza 95%
Ganglios Paraaórticos +	2,10	0,064	0,95 – 4,60
Sin ganglios afectados	0,99	0,984	0,47 – 2,06

En la regresión de Cox se compararon los grupos de pacientes sin ganglios afectados, y las pacientes con ganglios paraaórticos positivos frente al grupo de pacientes con ganglios pélvicos afectados. El resultado fue que, las pacientes con ganglios paraaórticos positivos incrementan el riesgo de fallecimiento en 2,10 veces con respecto a las pacientes con ganglios pélvicos positivos. La comparación con el grupo de pacientes sin ganglios afectados no se puede valorar, ya que no es significativo el valor de p .

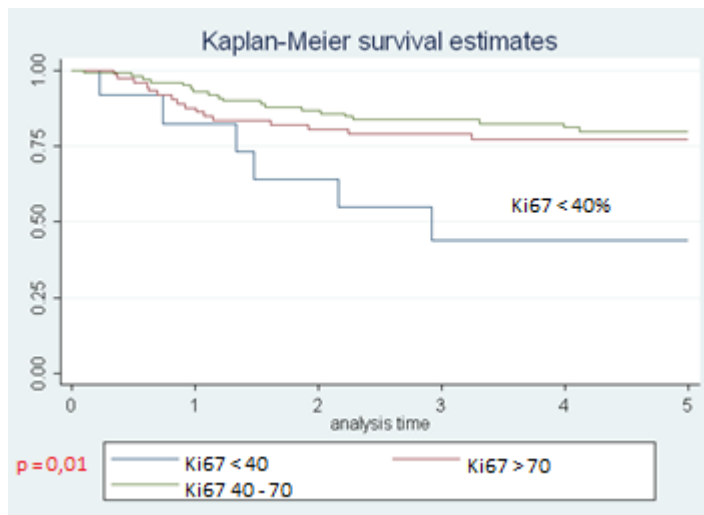
- **EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Ki67**

Para estudiar la fracción mantenemos los tres grupos: Ki67 con valores menores del 40% de células tumorales marcadas, entre el 40 y el 70% y con más del 70% de células tumorales marcadas.

Tabla 31.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de Ki67.

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
Ki67		
ki67 < 40%	44,00%	44,00%
ki67 40 -70%	78,98%	77,15%
ki67 >70%	83,64%	79,93%

Figura 50.-Función de supervivencia global a los 5 años dependiendo de la expresión de Ki67.



Regresión de Cox:

	Haz. Ratio	P> z	Intervalo de confianza 95%
Ki67 40 – 70	0,36	0,033	0,14 -0,92
Ki67 > 70%	0,28	0,008	0,11 – 0,71

Con la regresión de Cox se compararon los grupos de pacientes con valores de Ki67 mayores de 40% con el grupo de pacientes con expresión de Ki67 en menos del 40% de células tumorales marcadas.

Los datos indicaban que, las pacientes con valores entre 40-70% de ki67, tienen una reducción del riesgo de muerte un 64% mayor que las del grupo de menor del 40%. En las pacientes cuyo valor de ki67 es mayor del 70%, la reducción del riesgo de muerte llega hasta el 71,33 % mayor respecto al grupo de pacientes con Ki67<40.

- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53

Tabla 32.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p53.

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
p53		
p531≤0%	78,54%	74,17%
p53>10%	79,56%	77,01%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia global para la proteína p53 ($p = 0,843$)

- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p21waf

Tabla 33.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p21waf.

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
P21waf		
P21wa≤f20%	88,24%	82,72%
P21waf>20%	77,42%	74,94%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia global para la proteína p21waf ($p = 0,275$)

- CD34

Tabla 34.- Representación de la estimación de la supervivencia global a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de CD34.

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
CD34		
CD34≤15%	78,00%	75,95%
CD34>15%	80,05%	76,69%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia global para el marcador CD34 ($p = 0,863$).

3.-SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESION

A los 5 años de las 186 pacientes habían padecido una progresión de la enfermedad 58.

La supervivencia libre de progresión a los 3 años fue del 68,20% y del 67,44% a los 5 años.

En este estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de progresión con: el tipo histológico, los factores reguladores del ciclo celular (la proteína p53, la proteína p21) y los microvasos (CD34).

A continuación se expresa la magnitud del efecto, estimada por el hazard ratio (modelo de riesgo proporcional de Cox) de aquellas variables con valores estadísticamente significativos para supervivencia libre de progresión a los 5 años.

Tabla 35.-Representación de las probabilidades de supervivencia libre de progresión a los 5 años junto con su intervalo de confianza del 95% y el valor de p según la estimación de Kaplan-Meier. *Valores estadísticos significativos. * Límite de significació

VARIABLE	Supervivencia Libre de Progresión		
	SLP a los 5 años	Intervalo de confianza	P
ECOG			
ECOG 1	1	...	0,0003*
ECOG 2	0,7	0,62 - 0,77	
ECOG 3	0,38	0,19 - 0,57	
ECOG 4	0,5	0,05 - 0,84	
ECOG AGRUPADOS			
ECOG 1-2	0,73	0,65 - 0,77	0,001*
ECOG 3-4	0,38	0,21 - 0,55	
HISTOPATOLOGIA			
Carcinoma Epidermoide	0,67	0,59 - 0,74	0,81
Adenocarcinoma	0,64	0,44 - 0,79	
Adenoescamoso	1	...	
ESTADIO FIGO			
IB1	1	...	0,001*
IB2	0,77	0,56 - 0,89	
IIA	1	...	
IIB	0,76	0,63 - 0,84	
IIIA	
IIIB	0,53	0,41 - 0,65	
IVA	0,5	0,18 - 0,75	
FIGO Agrupado			
IB1 -IIB	0,78	0,69 - 0,85	0,001*
IIIA-IVA	0,52	0,40 - 0,63	
TAMAÑO TUMORAL			
<= 6 CM	0,78	0,67 - 0,86	0,003*
> 6 CM	0,58	0,48 - 0,67	
GANGLIOS POR IMAGEN			
Pélvicos	0,63	0,50 - 0,73	0,13
Paraaorticos	0,59	0,40 - 0,74	
Negativos	0,73	0,62 - 0,82	
GANGLIOS AGRUPADOS			
Negativos	0,73	0,62 - 0,82	0,07*
Positivos	0,62	0,51 - 0,70	
p53			
p53 <10	0,72	0,53 - 0,84	0,55
p53 >10	0,66	0,57 - 0,73	
p21			
p21 <20	0,72	0,53 - 0,84	0,58
p21 >20	0,66	0,58 - 0,73	
ki67			
ki67 < 40	0,31	0,06 - 0,62	0,06*
ki67 >40 >70	0,68	0,56 - 0,78	
ki67 >70	0,7	0,59 - 0,78	
CD34			
CD34 <15	0,64	0,50 - 0,74	0,44
CD34 >15	0,69	0,59 - 0,76	

- ECOG

Para su mejor estudio se reagrupan los pacientes:

ECOG 1-2

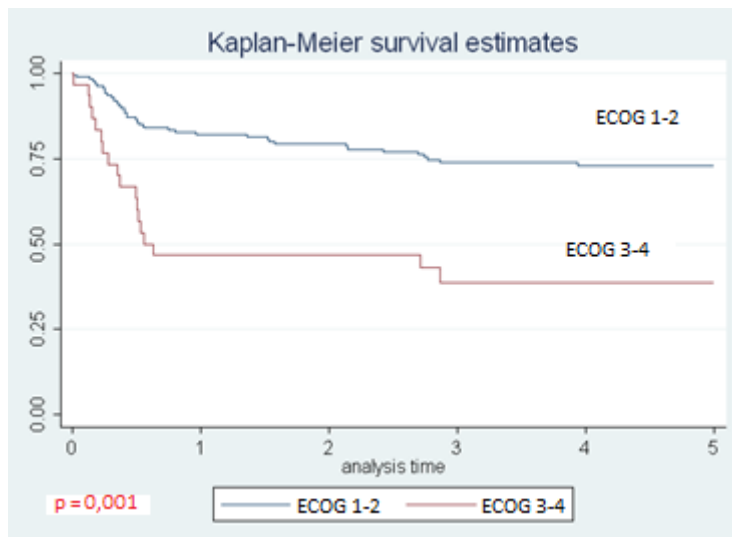
ECOG 3-4

La supervivencia libre de progresión estimada a los 3 años fue del 73,89% para el grupo de ECOG 1-2 y del 38,77% para el grupo de ECOG 3-4. A los 5 años la supervivencia libre de progresión estimada fue del 73,01% para el grupo ECOG 1-2 y del 38,77% para el grupo de ECOG 3-4.

Tabla 36.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de ECOG.

ECOG AGRUPADOS	SLP a los 3 años	SLP a los 5 años
ECOG 1-2	73,89%	73,01%
ECOG 3-4	38,77%	38,77%

Figura 46.- Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años de los dos grupos de pacientes con valores de ECOG 1-2 y 3-4.



Regresión de Cox

	Hazard Ratio	P> z	Intervalo de confianza
ECOG 3-4	3.18	0.000	1.81 – 5.56

Con la regresión de Cox se comparó la supervivencia libre de progresión de los dos grupos de ECOG, y el resultado fue que, las pacientes clasificadas en el grupo ECOG 3-4 tenían un riesgo de sufrir una progresión de su enfermedad 3,18 veces mayor que las pacientes que pertenecían al grupo ECOG 1-2.

- FIGO

Para su mejor estudio se reagrupan los pacientes:

FIGO \leq IIB: IA-IB-IIA-IIB

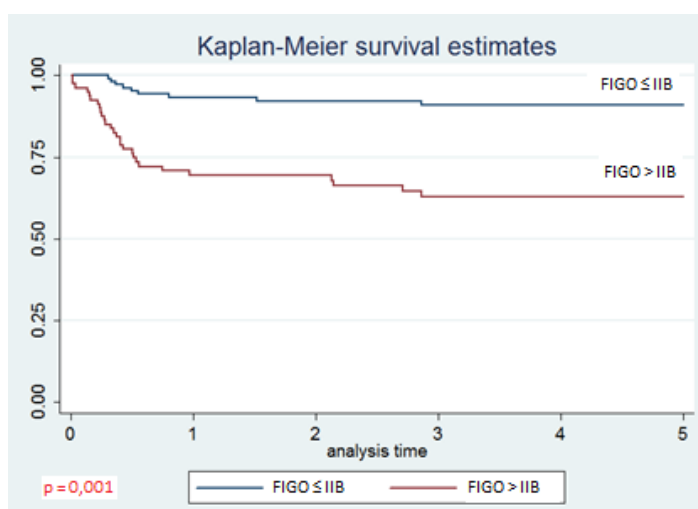
FIGO $>$ IIB: IIIA-IIIB-IVA

La supervivencia libre de progresión estimada a los 3 años fue del 78,80% para el grupo de FIGO \leq IIB y del 54,21% para el grupo de FIGO $>$ IIB. A los 5 años la supervivencia libre de progresión estimada fue del 78,80% para el grupo FIGO \leq IIB y del 52,57% para el grupo de FIGO $>$ IIB.

Tabla 37.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de FIGO.

	SLP a los 3 años	SLP a los 5 años
FIGO Agrupado		
FIGO \leq IIB	78,80%	78,80%
FIGO $>$ IIB	54,21%	52,57%

Figura 52.- Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años de las pacientes distribuidas por los valores de FIGO.



Regresión de Cox:

	Hazard Ratio	P> z	Intervalo de confianza
FIGO > IIB	2,89	0.000	1,69 - 4,94

El riesgo de progresión de la enfermedad a los 5 años de las pacientes del grupo FIGO > IIB, es 2,89 veces mayor que en las pacientes incluidas en el grupo de FIGO ≤ IIB.

- **TAMAÑO TUMOR**

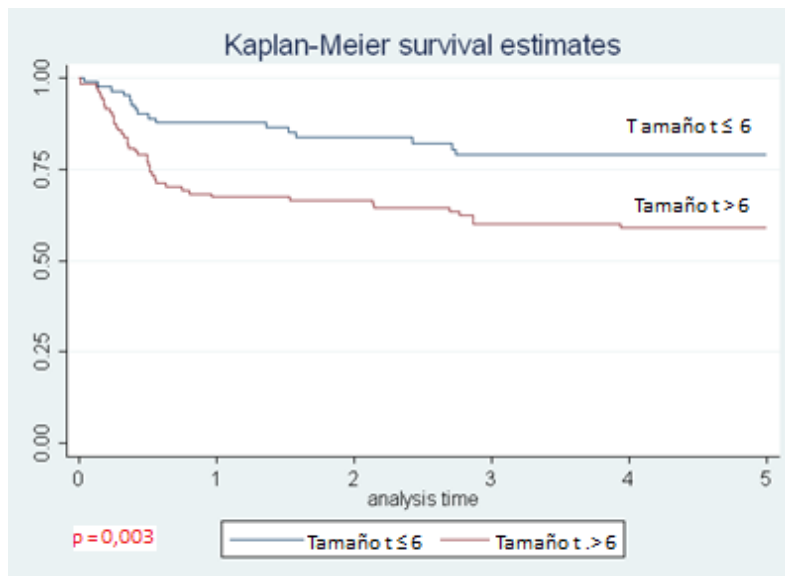
Las pacientes fueron distribuidas en dos grupos, las que tenían tumores menores de 6 cm y las pacientes con tumores mayores de 6 cm.

La supervivencia libre de progresión estimada a los 3 años fue del 78,84% % para la pacientes con tumores menores de 6 cm y del 60,04% para las pacientes con tumores mayores de ese valor. A los 5 años la supervivencia libre de progresión estimada fue del 78,84 % para los tumores menores de 6 cm y del 58,82% para los tumores mayores de 6 cm.

Tabla 38.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tamaño tumoral.

	SLP a los 3 años	SLP a los 5 años
TAMAÑO TUMORAL		
Tumores ≤ 6 cm.	78,84%	78,84%
Tumores > 6 cm.	60,04%	58,82%

Figura 53.-Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años dependiendo del tamaño tumoral.



Regresión de Cox:

	Hazard Ratio	P> z	Intervalo de confianza
Tamaño tumor > 6	2.28	0.005	1.28- 4.06

Las pacientes con tumores mayores de 6 cm tienen 2,28 veces más riesgo de tener una progresión de su enfermedad que las pacientes que tienen un tumor menor de 6 cm.

- TIPO HISTOLÓGICO

Tabla 39.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tipo histológico.

	SLP a los 3 años	SLP a los 5 años
HISTOPATOLOGIA		
Ca. Epidermoide	68,73%	67,82%
Adenocarcinoma	64,69%	64,69%
Adenoescamoso	100%	100%

No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tipos tumorales y la supervivencia libre de progresión ($p=0,814$)

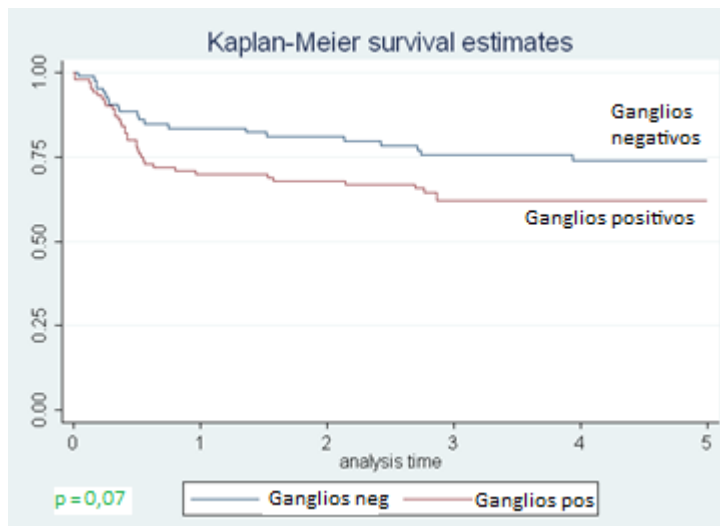
- AFECTACION GANGLIONAR

Se distribuyó a las pacientes en dos grupos, si tenían afectados los ganglios (pélvicos y paraaórticos) o si no los tenían.

Tabla 40.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes con o sin afectación ganglionar.

	SLP a los 3 años	SLP a los 5 años
GANGLIOS		
Ganglios negativos	75,38%	73,81%
Ganglios Afectados	62,11%	62,11%

Figura 54.-Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años dependiendo de la afectación ganglionar.



Para la supervivencia libre de progresión los valores estaban cercanos a la significación ($p = 0,07$)

Regresión de Cox:

	Hazard	$P> z $	Intervalo de confianza
Ganglios	1,61	0.078	0,94 - 2.76

Las pacientes con ganglios afectados tendrían 1,61 veces más riesgo de tener una progresión de su enfermedad comparada con las pacientes sin ganglios afectos.

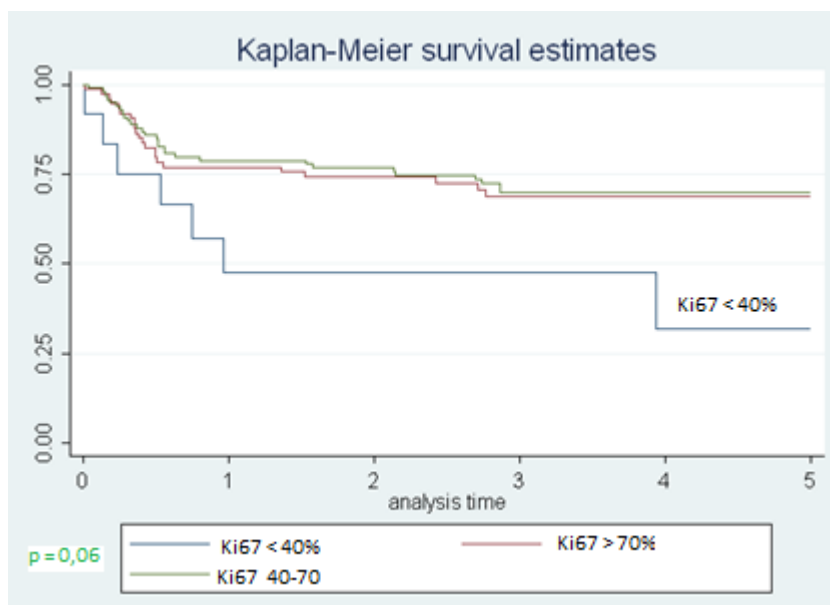
- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Ki67

Para estudiar la fracción mantenemos los tres grupos: Ki67 con valores menores del 40% de células tumorales marcadas, entre el 40 y el 70% y con más del 70% de células tumorales marcadas.

Tabla 41.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de Ki67.

Ki67	SLP los 3 años	SLP a los 5 años
ki67 < 40	47,62%	31,75%
ki67 40 - 70	68,91%	68,91%
ki67 >70	70,04%	70,04%

Figura 55.-Función de supervivencia libre de progresión a los 5 años dependiendo de la expresión de Ki67.



Regresión de Cox:

	Hazard Ratio	$P > z $	Intervalo de confianza 95%
ki67 40 - 70	0,41	0.045	0,17 – 0,97
ki67 >70	0,38	0.025	0,17 – 0,88

Las pacientes con valores de ki67 entre 40-70% y mayores de 70% tienen una reducción del riesgo de progresión de la enfermedad del 58,2% y el 61,2% respectivamente, sobre el grupo de pacientes con valores de ki67 por debajo del 40%.

- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53

Tabla 42.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p53.

	SLP a los 3 años	SLP a los 5 años
p53		
p53≤10%	72,62%	72,62%
p53>10%	67,21%	66,29%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia libre de progresión para la proteína p53 ($p = 0,555$).

- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p21waf

Tabla 43.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p21waf.

	SLP a los 3 años	SLP a los 5 años
P21waf		
P21waf≤20%	72,22%	72,22%
P21waf>20%	67,29%	66,40%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia libre de progresión para la proteína p21waf ($p = 0,582$).

- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CD34

Tabla 44.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de progresión a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de CD34.

	SLP a los 3 años	SLP a los 5 años
CD34		
CD34≤15	64,09%	64,09%
CD34>15	70,40%	69,20%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia libre de progresión para el marcador CD34 ($p = 0,446$).

4.-SUPERVIVENCIA LIBRE DE FRACASO LOCAL

La supervivencia libre de fracaso local fue del 79,04% tanto a los 3 años como a los 5 años.

A los 5 años, de las 186 pacientes habían padecido un fracaso local 37 (19,89%).

Cuando se valora el fracaso pélvico no se observan diferencias estadísticamente significativas en este estudio con: el tipo histológico y los factores reguladores del ciclo celular (la proteína p53y la proteína p21) y los microvasos (CD34).

A continuación se expresa la magnitud del efecto, estimada por el hazard ratio (modelo de riesgo proporcional de Cox) de aquellas variables con valores estadísticamente significativos para el fracaso local.

Tabla 45.- Representación de las probabilidades de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años junto con su intervalo de confianza del 95% y el valor de p según la estimación de Kaplan-Meier *Valores estadísticos significativos.* Límite de significación

Supervivencia libre de Fracaso Local			
VARIABLE	SLFL a los 5 años	Intervalo de confianza 95%	P valor
ECOG			
ECOG 1	1	...	0,0015*
ECOG 2	0,82	0,78 - 0,87	
ECOG 3	0,53	0,29 - 0,72	
ECOG 4	0,50	0,50 - 0,84	
ECOG AGRUPADOS			
ECOG 0-1	0,83	0,77 - 0,89	0,0001*
ECOG 2-4	0,51	0,30 - 0,69	
HISTOPATOLOGIA			
Carcinoma	0,80	0,72 - 0,85	0,595
Adenocarcinoma	0,72	0,52 - 0,85	
Adenoescamoso	1	..	
ESTADIO FIGO			
IB1	1	...	0,001*
IB2	0,92	0,73 - 0,98	
IIA	1	...	
IIB	0,88	0,78 - 0,94	
IIIA	
IIIB	0,65	0,52 - 0,76	
IVA	0,50	0,18 - 0,75	
FIGO Agrupado			
IB1 -IIB	0,90	0,83 - 0,95	0,001*
IIIA-IVA	0,28	0,50 - 0,72	
TAMAÑO TUMORAL			
<= 6 CM	0,85	0,75 - 0,91	0,049*
> 6 CM	0,73	0,63 - 0,81	
GANGLIOS POR			
Pélvicos	0,73	0,61 - 0,83	0,190
Paraaorticos	0,74	0,54 - 0,86	
Negativos	0,85	0,75 - 0,91	
GANGLIOS			
Negativos	0,85	0,75 - 0,91	0,071*
Positivos	0,73	0,63 - 0,81	
p53			
p53 <10	0,82	0,64 - 0,91	0,718
p53 >10	0,78	0,70 - 0,84	
p21			
p21 <20	0,85	0,67 - 0,93	0,437
p21 >20	0,77	0,69 - 0,83	
ki67			
ki67 < 40	0,47	0,18 - 0,72	0,008*
ki67>40 >70	0,82	0,71 - 0,89	
ki67 >70	0,80	0,70 - 0,86	
CD34			
CD34 <15	0,71	0,58 - 0,81	0,079
CD34 >15	0,83	0,74 - 0,88	

- ECOG

Para su mejor estudio se reagrupan los pacientes:

ECOG 1-2

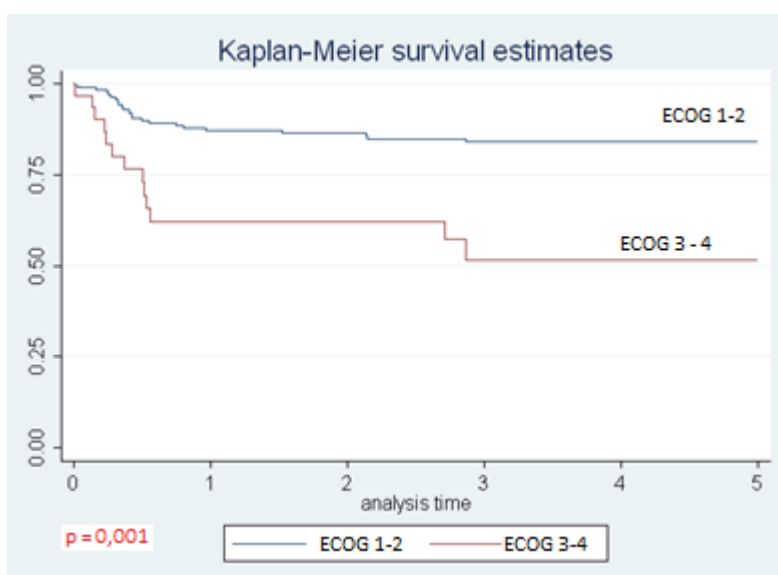
ECOG 3-4

La supervivencia libre de fracaso local estimada a los 3 años fue del 83,99% para el grupo de ECOG 1-2 y del 51,46% para el grupo de ECOG 3-4 . A los 5 años la supervivencia libre de fracaso local estimada fue del 83,99% para el grupo ECOG 1-2 y del 51,46% para el grupo de ECOG 3-4.

Tabla 46.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de ECOG.

	SLFL a los 3 años	SLFL a los 5 años
ECOG AGRUPADOS		
ECOG 1-2	83,99%	83,99%
ECOG 3-4	51,46%	51,46%

Figura 56.- Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años de los dos grupos de pacientes con valores de ECOG 1-2 y 3-4.



Regresión de Cox

	Hazard Ratio	P> z	Intervalo de confianza 95%
ECOG 3-4	3.65	0,000	1,85 - 7,20

Con la regresión de Cox se comparó la supervivencia libre de fracaso local de los dos grupos de ECOG, y el resultado fue que, las pacientes clasificadas en el grupo ECOG 3-4 tenían un riesgo de sufrir fracaso local 3,65 veces mayor que las pacientes que pertenecían al grupo ECOG 1-2.

- FIGO

Para su mejor estudio se reagrupan los pacientes:

FIGO \leq IIB: IA-IB-IIA-IIB

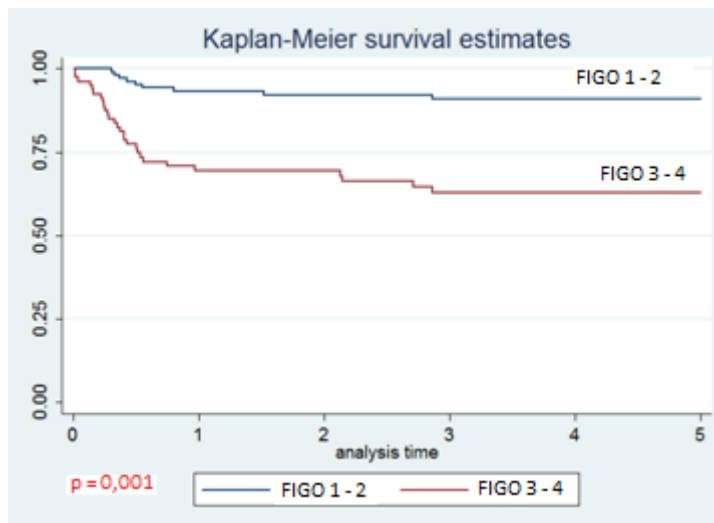
FIGO >IIB: IIIA-IIIB-IVA

La supervivencia libre de fracaso local estimada a los 3 años fue del 90,99% para el grupo de FIGO \leq IIB y del 62,88% para el grupo de FIGO >IIB. A los 5 años la supervivencia libre de fracaso local estimada fue del 90,99% para el grupo FIGO \leq IIB y del 62,88% para el grupo de FIGO >IIB.

Tabla 47.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes con diferentes grupos de FIGO.

	SLFL a los 3 años	SLFL a los 5 años
FIGO Agrupado		
FIGO \leq IIB	90,99%	90,99%
FIGO >IIB	62,88%	62,88%

Figura 57.- Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años de las pacientes distribuidas por los valores de FIGO.



Regresión de Cox:

	Hazard	P> z	Intervalo de confianza
FIGO >IIB	5,05	0.000	2,38 -10,72

El riesgo de fracaso local a los 5 años en las pacientes distribuidas en grupos FIGO mayores de IIB es 5,05 veces mayor que en las pacientes incluidas en grupos de FIGO \leq IIB.

- TAMAÑO TUMORAL

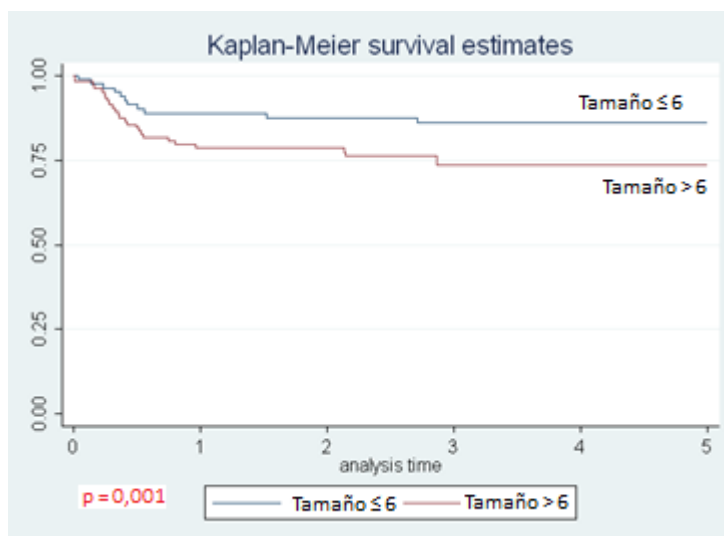
Las pacientes fueron distribuidas en dos grupos, las que tenían tumores menores de 6 cm y las pacientes con tumores mayores de 6 cm.

La supervivencia libre de fracaso local estimada a los 3 años fue del 85,94% para las pacientes con tumores menores o iguales a 6 cm y del 73,55% para las pacientes con tumores mayores de 6 cm. A los 5 años la supervivencia libre de fracaso local estimada fue del 85,94 % para el grupo de tumores menores o iguales a 6 cm y del 73,55% para el grupo de tumores mayores de 6 cm.

Tabla 48.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tamaño tumoral.

	SLFL a los 3 años	SLFL a los 5 años
TAMAÑO TUMORAL		
Tumores \leq 6 cm.	85,94%	85,94%
Tumores > 6 cm.	73,55%	73,55%

Figura 58.-Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años dependiendo del tamaño tumoral.



Regresión de Cox:

	Hazard	$P> z $	Intervalo de confianza
Tamaño tumor	1,99	0,05	0,98 – 4,04

Las pacientes con tumores mayores de 6 cm tienen un incremento de fracaso local 1,99 veces mayor que las pacientes con tumores menores de 6 cm.

- TIPO HISTOLÓGICO

Tabla 49.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por el tipo histológico.

	SLFL a los 3 años	SLFL a los 5 años
HISTOPATOLOGIA		
Ca. Epidermoide	80,27%	80,27%
Adenocarcinoma	72,30%	72,30%
Adenoescamoso	100%	100%

No se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes tipos tumorales y la supervivencia libre de fracaso local ($p=0,595$)

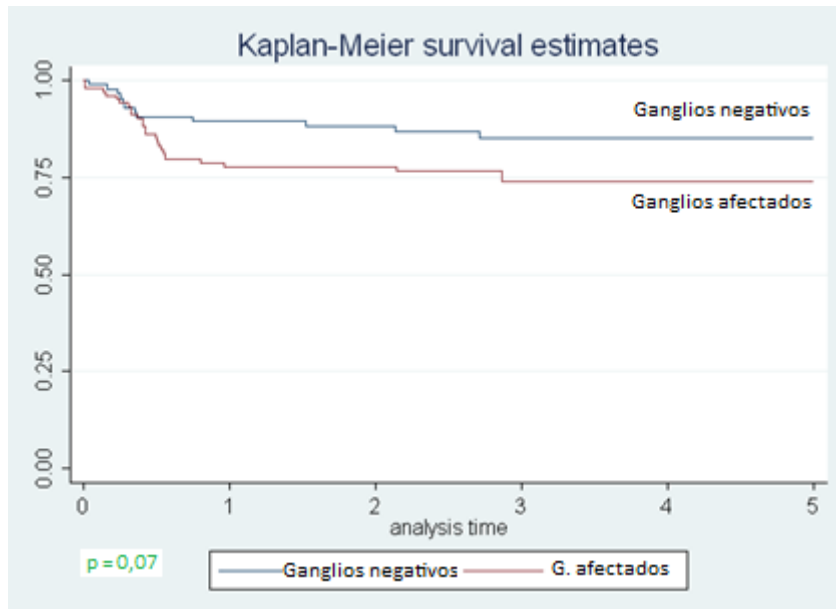
- AFECTACION GANGLIONAR

Se distribuyó a las pacientes en dos grupos, si tenían afectados los ganglios (pélvicos y paraaórticos) o si no los tenían.

Tabla 50.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes con o sin afectación ganglionar.

	SLFL a los 3 años	SLFL a los 5 años
GANGLIOS		
Ganglios negativos	85,06%	85,06%
Ganglios Afectados	73,83%	73,83%

Figura 59.-Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años dependiendo de la afectación ganglionar.



Para la supervivencia libre de progresion los valores estaban cercanos a la significación ($p = 0,07$)

Regresión de Cox:

	Hazard	P> z	Intervalo de confianza
Ganglios	1,86	0.076	0,93 - 3.71

Las pacientes con ganglios afectados tenían un riesgo de fracaso local 1,86 veces mayor que las pacientes sin ganglios afectados.

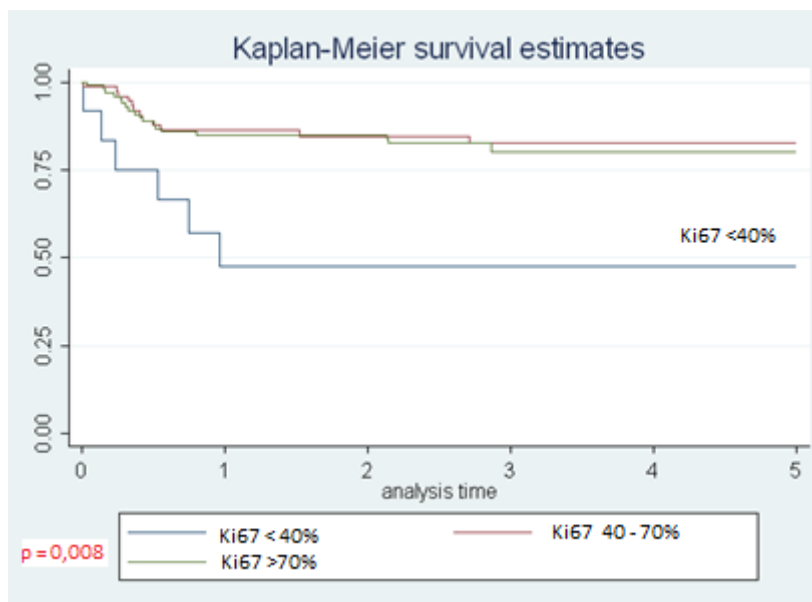
- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Ki67

Para estudiar la fracción mantuvimos los tres grupos: Ki67 con valores menores del 40% de células tumorales marcadas, entre el 40 y el 70% y con más del 70% de células tumorales marcadas.

Tabla 51.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de Ki67.

	SLFL a los 3 años	SLFL a los 5 años
Ki67		
ki67 < 40	47,62%	47,62%
ki67 > 40 >70	82,75%	82,75%
ki67 >70	80,04%	80,04%

Figura 60.-Función de supervivencia libre de fracaso local a los 5 años dependiendo de la expresión de Ki67.



Regresión de Cox:

	Hazard Ratio	P> z	Intervalo de confianza
ki67 40 - 70	0,25	0.007	0,09 – 0,68
ki67 >70	0,29	0.009	0,11 – 0,74

Aquí se comparaban los valores de ki67 menores de 40% frente a los grupos para valores de ki67 entre 40-70% y mayor de 70%.

Los datos indicaban que las pacientes con valores entre 40-70% de ki67, tenían un riesgo de fracaso local un 75% menor que las pacientes que tenían valores de ki67 menores del 40%. En el grupo cuyo valor de ki67 estaba por encima del 70%, el riesgo de fracaso local respecto al grupo de valores de ki67 menores del 40% fue un 71% menor.

- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p53

Tabla 52.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p53.

	SLFL a los 3 años	SLFL a los 5 años
p53		
p53≤10%	82,04%	82,04%
p53>10%	78,36%	78,36%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia libre de fracaso local para la proteína p53 ($p = 0,718$).

- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA p21waf

Tabla 53.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de p21waf.

	SLFL a los 3 años	SLFL a los 5 años
P21waf		
P21waf<20%	85,10%	85,10%
P21waf>20%	77,74%	77,74%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia libre de fracaso local para la proteína p21waf ($p = 0,437$)

- CD34

Tabla 54.- Representación de la estimación de la supervivencia libre de fracaso local a los 3 y 5 años para las pacientes, distribuidas por la expresión de CD34.

	SLFL a los 3 años	SLFL a los 5 años
CD34		
CD34<15%	71,47%	71,47%
CD34>15%	83,18%	83,18%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia libre de fracaso local para el marcador CD34 ($p = 0,0798$).

5.-RELACION ENTRE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS Y LOS FACTORES CLINICOS.

Una vez realizado el análisis univariante, para las diferentes variables y estudiada su influencia en el fracaso local, la progresión y la supervivencia global, se hizo el análisis multivariante.

Se comprobó si existía relación entre los diferentes factores pronósticos clínicos (ECOG, FIGO, tamaño tumoral, ganglios e histología) y los marcadores moleculares que estudiamos: p53, p21, ki67 y CD34.

Se representaron en tablas todos los resultados: el número de pacientes que expresa cada marcador en relación a cada variable clínica, el porcentaje que supone respecto al total de la población a estudio, y el *p valor* de cada variable clínica con cada proteína estudiada.

- PROTEINA p53

La proteína p53 se consideró que tiene una expresión baja cuando su expresión fue menor del 10% de células tumorales marcadas, y alta cuando fue mayor de ese valor.

Tabla 55.-Expresión de p53 en relación con las variables clínicas.

Variable	Total n	Expresión de p53		p valor
		Baja n (%)	Alta n (%)	
ECOG				P 0,072
ECOG 1-2	156	32	124	
ECOG 3-4	30	2 (6,67)	28	
HISTOPATOLOGIA				p 0,866
Carcinoma Epidermoide	155	28	127	
Adenocarcinoma	30	6 (20)	24 (80)	
Adenoescamoso	1	0 (0,00)	1 (100)	
ESTADIO FIGO				p 0,236
IB1	4	0 (0,00)	4 (100)	
IB2	29	7	22	
IIA	6	2	4	
IIB	67	9	58	
IIIA	1	1 (100)	0 (0,00)	
IIIB	69	13	56	
IVA	10	2 (20)	8	
FIGO Agrupado				p 0,598
IB1 -IIB	106	18	88	
IIIA-IVA	80	16 (20)	64 (80)	
TAMAÑO TUMORAL				p 0,997
≤6 CM	82	15	67	
> 6 CM	104	19	85	
GANGLIOS POR IMAGEN				p 0,846
Pélvicos	68	11(16,18)	57(83,82)	
Paraaórticos	32	6(18,75)	26(81,25)	
Negativos	86	17(19,77)	69(80,23)	
GANGLIOS AGRUPADOS				p 0,626
Negativos	86	17(19,77)	69(80,23)	
Positivos	100	17(17)	83(83)	

✓ Proteína p53 y ECOG

Tabla 56.- Expresión de la proteína p53 y el estado del paciente

	Total Pacientes n	Expresión de p53		p valor
		Baja n (%)	Alta n (%)	
ECOG				P 0,072
ECOG 1-2	156	32 (20,51)	124 (79,49)	
ECOG 3-4	30	2 (6,67)	28 (93,33)	

Se ha distribuido según los valores de ECOG en dos grupos. Se representa la distribución de p53 para cada uno de los grupos.

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,072, por encima del valor de significación), por lo tanto no existe asociación entre ambas variables.

✓ Proteína p53 y FIGO

Tabla57.- Expresión de la proteína p53 en los diferentes grupos de estadio FIGO.

	Total n	Expresión de p53		p valor
		Baja n (%)	Alta n	
FIGO				p 0,598
IB1 -IIB	106	18	88	
IIIA-IVA	80	16 (20)	64 (80)	

Se ha distribuido según los valores de FIGO en dos grupos. Se representa la distribución de p53 para cada uno de los grupos.

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,598, por lo tanto no existe asociación entre FIGO y expresión de proteína p53.

✓ Proteína p53 y Tamaño tumoral

Tabla 58.- Expresión de la proteína p53 y el tamaño tumoral.

	Total	Expresión de p53		<i>p</i> valor
	n	Baja n	Alta n	
TAMAÑO				p 0,997
≤ 6 CM	82	15	67	
> 6 CM	104	19	85	

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor por encima del valor de significación, por lo tanto no existe asociación entre Tamaño tumoral y expresión de proteína p53.

✓ Proteína p53 y Tipo histológico

Tabla 59.- Expresión de la proteína p53 y el tipo histológico.

	Total	Expresión de p53		<i>p</i> valor
	n	Baja n	Alta n	
HISTOPATOLOGIA				p 0,866
Carcinoma Epidermoide	155	28	127	
Adenocarcinoma	30	6	24	
Adenoescamoso	1	0	1	

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,866, por encima del valor de significación ($p < 0,05$), por lo tanto no existe asociación entre el tipo de tumor y la expresión de proteína p53.

✓ Proteína p53 y Afectación ganglionar

Tabla 60.- Expresión de la proteína p53 y la afectación ganglionar.

	Total n	Expresión de p53		<i>p</i>
		Baja n	Alta n	
GANGLIOS				p 0,626
Negativos	86	17(19,77)	69(80,23)	
Positivos	100	17(17)	83(83)	

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,626, por encima del valor de significación, por lo tanto no existe asociación entre afectación ganglionar y expresión de proteína p53.

- PROTEINA p21waf

La proteína p21waf consideramos que tenía una expresión baja cuando el número de células tumorales marcadas era menor del 20%, y alta cuando era mayor de ese valor.

Tabla 61.- Expresión de la proteína p21waf en relación con los factores clínicos

Variable	Total Pacientes n	Expresión de p21waf		p valor
		Baja n (%)	Alta n (%)	
ECOG				<i>p</i> 0,803
ECOG 0-1	156	29(18,59)	127(81,41)	
ECOG 2-3	30	5(16,67)	25(83,33)	
HISTOPATOLOGIA				<i>p</i> 0,016
Carcinoma Epidermoide	155	23(14,84)	132(85,16)	
Adenocarcinoma	30	11(36,67)	19(63,33)	
Adenoescamoso	1	0(0,00)	1(100)	
ESTADIO FIGO				<i>p</i> 0,466
IB1	4	0(0,00)	4(100)	
IB2	29	9(31,03)	20(68,97)	
IIA	6	1(16,67)	5(83,33)	
IIB	67	13(19,40)	54(80,60)	
IIIA	1	0(0,00)	1(100)	
IIIB	69	9(13,04)	60(86,96)	
IVA	10	2(20)	8(80)	
FIGO Agrupado				<i>p</i> 0,165
IB1 -IIB	106	23(21,70)	83(78,30)	
IIIA-IVA	80	11(13,75)	69(86,25)	
TAMAÑO TUMORAL				<i>P</i> 0,125
<= 6 CM	82	19(23,17)	63(76,83)	
> 6 CM	104	15(14,42)	89(85,58)	
GANGLIOS POR IMAGEN				<i>p</i> 0,154
Pélvicos	68	14(20,59)	54(79,41)	
Paraaorticos	32	2(6,25)	30(93,75)	
Negativos	86	18(20,93)	68(79,07)	
GANGLIOS AGRUPADOS				<i>p</i> 0,386
Negativos	86	18(20,93)	68(79,07)	
Positivos	100	16(16,00)	84(84,00)	

✓ Proteína p21waf y ECOG

Tabla 62.- Expresión de la proteína p21waf y el estado del paciente

	Total n	Expresión de p21waf		p valor
		Baja n	Alta n (%)	
ECOG				<i>p</i> 0,803
ECOG 1-2	156	29(18,59)	127(81,41)	
ECOG 3-4	30	5(16,67)	25(83,33)	

Se ha distribuido según los valores de ECOG en dos grupos. Se representa la distribución de p21waf para cada uno de los grupos.

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,803, por encima del valor de significación ($p < 0,05$), por lo tanto no existe asociación entre ECOG y expresión de proteína p21waf.

✓ Proteína p21waf y FIGO

Tabla 63.- Expresión de la proteína p21waf y los estadios FIGO.

	Total n	Expresión de p21waf		<i>p</i> valor
		Baja n (%)	Alta n (%)	
FIGO Agrupado				p 0,165
IB1 -IIB	106	23 (21,70)	83 (78,30)	
IIIA-IVA	80	11 (13,75)	69 (86,25)	

Se ha distribuido según los valores de FIGO en dos grupos. Se representa la distribución de p21waf para cada uno de los grupos.

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,165), por lo tanto no existe asociación entre FIGO y expresión de proteína p21waf.

✓ Proteína p21waf y Tamaño tumoral

Tabla 64.- Expresión de la proteína p21waf y el tamaño tumoral.

	Total n	Expresión de p21waf		<i>p</i> valor
		Baja n (%)	Alta n (%)	
TAMAÑO TUMORAL				p 0,125
<= 6 CM	82	19 (23,17)	63 (76,83)	
> 6 CM	104	15 (14,42)	89 (85,58)	

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,125, por encima del valor de significación, por lo tanto no existe asociación entre Tamaño tumoral y expresión de proteína p21waf.

✓ Proteína p21waf y Tipo histológico

Tabla 65.- Expresión de la proteína p21waf y el tipo histológico.

	Total n	Expresión de p21waf		<i>p</i> valor
		Baja n	Alta n	
HISTOPATOLOGIA				p 0,016
Carcinoma Epidermoide	155	23 (14,84)	132 (85,16)	
Adenocarcinoma	30	11 (36,67)	19 (63,33)	
Adenoescamoso	1	0 (0,00)	1 (100)	

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,016, por debajo del valor de significación ($p < 0,05$), por lo tanto existe asociación entre el tipo de tumor y la expresión de proteína p21waf.

La prueba de chi cuadrado contrasta la hipótesis de que las variables son independientes frente a que una variable se distribuye de modo diferente para diversos niveles de la otra.

✓ Proteína p21waf y Afectación ganglionar

Tabla 66.- Expresión de la proteína p21waf y la afectación ganglionar.

	Total n	Expresión de p21waf		<i>p</i> valor
		Baja n (%)	Alta n	
GANGLIOS				p 0,386
Negativos	86	18(20,93)	68(79,0)	
Positivos	100	16(16,00)	84(84,0)	

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,386, por encima del valor de significación ($p < 0,05$), por lo tanto no existe asociación entre afectación ganglionar y expresión de proteína p21waf.

- PROTEINA CD34

La proteína CD34 consideramos que tiene una expresión baja cuando es menor de 15 vasos, y alta cuando es mayor de ese valor.

Tabla 66.- Expresión de la proteína CD34 en relación con los factores clínicos

Variable	Total n	Expresión de CD34		p
		Baja n (%)	Alta n (%)	
ECOG				P 0,244
ECOG 0-1	156	59(37,82)	97(62,18)	
ECOG 2-3	30	8(26,67)	22(73,33)	
HISTOPATOLOGIA				p 0,674
Carcinoma Epidermoide	155	55(35,48)	100(64,52)	
Adenocarcinoma	30	12(40)	16(60)	
Adenoescamoso	1	0(0,00)	1(100)	
ESTADIO FIGO				p 0,418
IB1	4	2(50)	2(50)	
IB2	29	11(37,93)	18(62,07)	
IIA	6	3(50)	3(50)	
IIB	67	26(38,81)	41(61,19)	
IIIA	1	1(100)	0(0,00)	
IIIB	69	23(33,33)	46(66,67)	
IVA	10	1(100)	9(90)	
FIGO Agrupado				p 0,239
IB1 -IIB	106	42(39,62)	64(60,38)	
IIIA-IVA	80	25(31,25)	55(68,75)	
TAMAÑO TUMORAL				P 0,869
<= 6 CM	82	29(35,37)	53(64,63)	
> 6 CM	104	38(36,54)	66(63,46)	
GANGLIOS POR IMAGEN				p 0,542
Pélvicos	68	22(32,35)	46(67,65)	
Paraaorticos	32	14(43,75)	18(56,25)	
Negativos	86	31(36,01)	55(63,95)	
GANGLIOS AGRUPADOS				p 0,995
Negativos	86	31(36,05)	55(63,95)	
Positivos	100	36(36)	64(64)	

✓ Proteína CD34 y ECOG

Tabla 67.- Expresión de la proteína CD34 y el estado del paciente

	Total n	Expresión de CD34		p
		Baja n (%)	Alta n (%)	
ECOG				P 0,244
ECOG 0-1	156	59(37,82)	97(62,18)	
ECOG 2-3	30	8(26,67)	22(73,33)	

Se ha distribuido según los valores de ECOG en dos grupos. Se representa la distribución de CD34 para cada uno de los grupos.

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,244, por encima del valor de significación ($p < 0,05$), por lo tanto no existe asociación entre ECOG y expresión de proteína CD34.

✓ Proteína CD34 y FIGO

Tabla 68.- Expresión de la proteína CD34 y los estadios FIGO.

	Total n	Expresión de CD34		p valor
		Baja n (%)	Alta n	
FIGO Agrupado				p 0,239
IB1 -IIB	106	42 (39,62)	64 (60,38)	
IIIA-IVA	80	25 (31,25)	55 (68,75)	

Se ha distribuido según los valores de FIGO en dos grupos. Se representa la distribución de CD34 para cada uno de los grupos.

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,239, por encima del valor de significación ($p < 0,05$), por lo tanto no existe asociación entre FIGO y expresión de proteína CD34.

✓ Proteína CD34 y Tamaño tumoral

Tabla 69.- Expresión de la proteína CD34 y el tamaño tumoral.

	Total	Expresión de CD34		p valor
	n	Baja n	Alta n	
TAMAÑO TUMORAL				p 0,869
<= 6 CM	82	29 (35,37)	53 (64,63)	
> 6 CM	104	38 (36,54)	66 (63,46)	

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,869, por encima del valor de significación ($p < 0,05$), por lo tanto no existe asociación entre Tamaño tumoral y expresión de proteína CD34.

✓ Proteína CD34 y Tipo histológico

Tabla 70.- Expresión de la proteína CD34 y el tipo histológico.

	Total	Expresión de CD34		p valor
	n	Baja n	Alta n	
HISTOPATOLOGIA				p 0,674
Carcinoma Epidermoide	155	55 (35,48)	100 (64,52)	
Adenocarcinoma	30	12 (40,00)	16 (60,00)	
Adenoescamoso	1	0 (0,00)	1 (100)	

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,674, por encima del valor de significación ($p < 0,05$), por lo tanto no existe asociación entre el tipo de tumor y la expresión de proteína CD34.

✓ Proteína CD34 y Afectación ganglionar

Tabla 71.- Expresión de la proteína p53 y la afectación ganglionar.

	Total n	Expresión de CD34		p
		Baja n	Alta n	
GANGLIOS				p 0,995
Negativos	86	31(36,05)	55(63,95)	
Positivos	100	36(36,00)	64(64,00)	

El *P* valor de la prueba de Chi-cuadrado para estos marcadores tiene un valor de 0,995, por encima del valor de significación ($p < 0,05$), por lo tanto no existe asociación entre afectación ganglionar y expresión de proteína CD34.

ESTUDIO DE P53/P21WAF CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

Se hizo un estudio con los diferentes valores de expresión de ambos marcadores para ver si asociados tenían algún impacto en la supervivencia global.

Tabla 72.- Supervivencia global estimada a los 3 y 5 años para la asociación p53 y p21waf

	SG a los 3 años	SG a los 5 años
p53/p21waf		
p53<10%/p21<20%	92,86%	81,25%
p53<10%/ p21>20%	67,56%	67,56%
p53>10%/ p21<20%	85,00%	85,00%
p53>10%/ p21>20%	75,99%	75,99%

Se realizó un estudio de Chi cuadrado cuyos resultados fueron:

Chi cuadrado = 1,92 $p = 0,59$.

El valor de $p = 0,59$ es mayor de 0,05 que es el nivel de significación marcado habitualmente, lo que nos indica que no se encuentran diferencias significativas

entre las diferentes grupos de valores de p53/p21waf y la supervivencia global de las pacientes.

ESTUDIO DE P53/P21WAF CON Ki67.

Se estudió la relación entre p53 y p21waf, reguladores del ciclo celular y la proliferación, representada por Ki67.

Tabla 73.-Porcentaje de pacientes con los diferentes valores de Ki67 en relación a los diferentes valores de p53 / p21waf.

p53/p21waf	ki67		
	ki67 < 40%	ki67 >40 - 70%	ki67 >70%
p53 ↓ p21↓	7,14	14,29	78,57
p53 ↓ p21↑	15	40	45
p53 ↑ p21↓	5,00	60,00	35
p53 ↑ p21↑	5,3	40,15	54,55

Se realizaron diferentes Chi cuadrado para ver como afectaban los diferentes valores de Ki 67 y los resultados fueron:

Para el grupo de pacientes con valores de Ki67 < 40% y cualquier valor de p53 y de p21waf: Chi cuadrado = 0,30. $P=0,58$.

Para el grupo de pacientes con valores de Ki67 40 -70% y cualquier valor de p53 y de p21waf: Chi cuadrado = 0,013. $P=0,90$.

Para el grupo de pacientes con valores de Ki67 > 70% y cualquier valor de p53 y de p21waf: Chi cuadrado = 22,83. $P=0,001^*$.

Se encontró significación para la expresión de Ki67 cuando esta era mayor del 70% de las células tumorales marcadas. Para comprobar si la influencia sobre ki67 era debido a p53, p21waf, o a ambos, se realizó una Chi cuadrado con el grupo de Ki67> 70% y cada uno de los marcadores por separado p53 y p21waf.

Para el valor de Ki67 >70%, p21waf = 0 y cualquier valor de p53:

Chi cuadrado =7,19. $P = 0,02^*$.

Para el valor de Ki67 >70%, p21waf = 1 y cualquier valor de p53:

Chi cuadrado =2,77. $P = 0,24$.

Expresión de las proteínas de este trabajo:

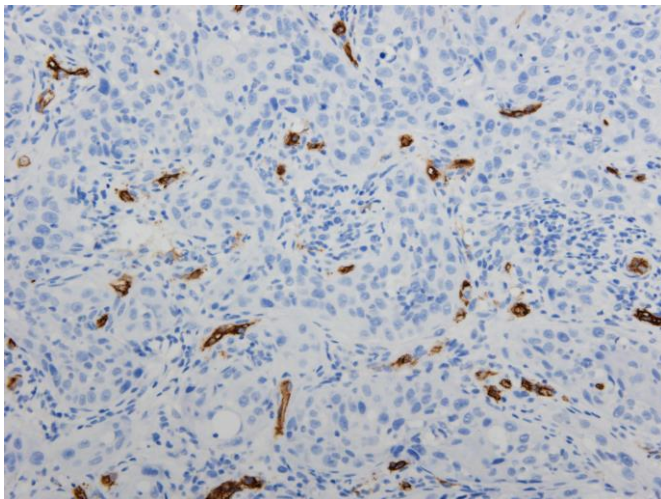


Figura 61.-Expresión de la proteína CD34 (20X).

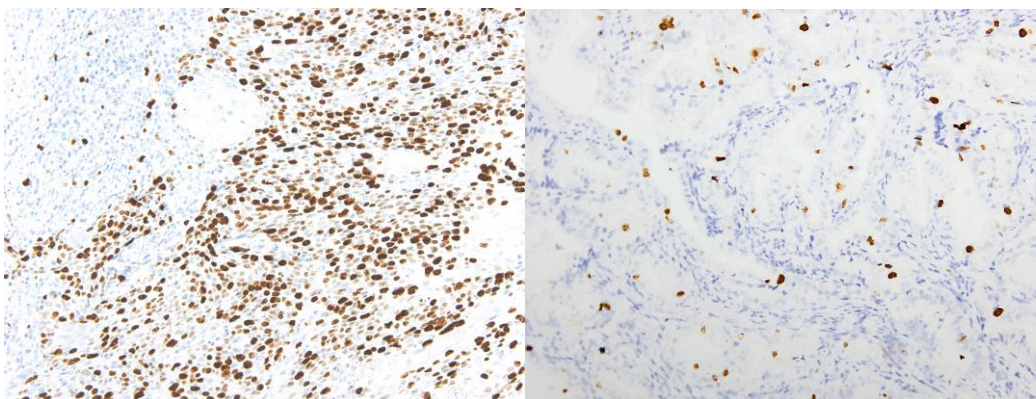


Figura 62.-Alta y baja expresión de la proteína ki67 (20X).

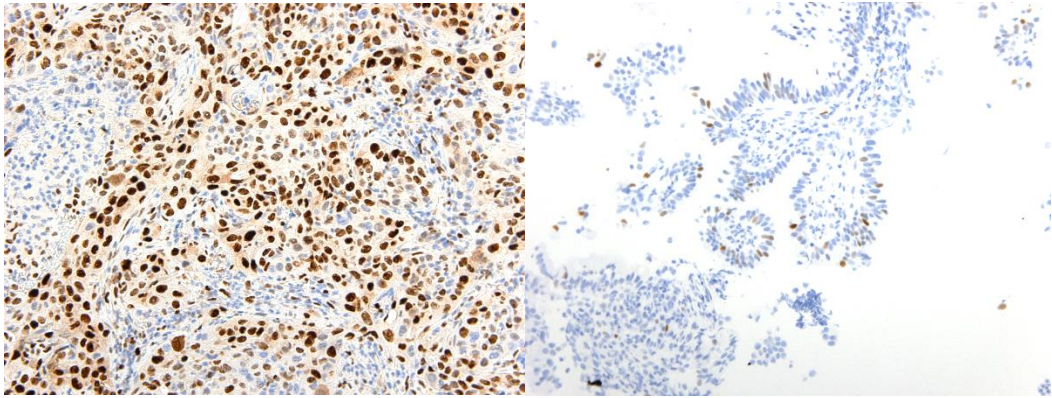


Figura 63.-Alta y baja expresión de la proteína p21waf (20X).

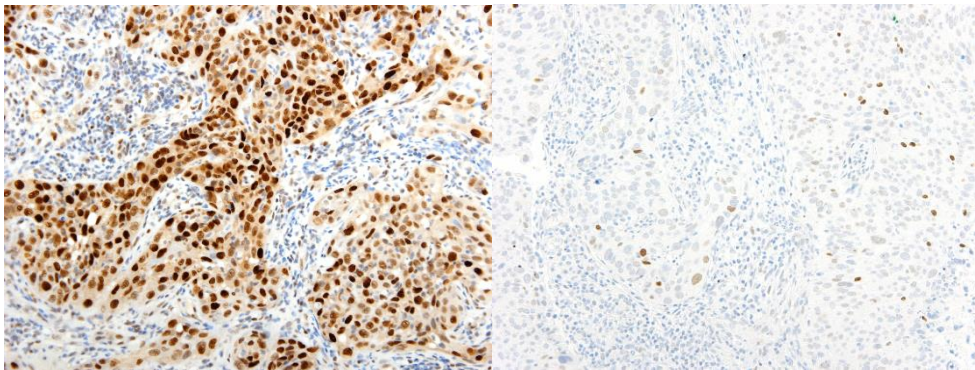


Figura 63.-Alta y baja expresión de la proteína p53 (20X).

DISCUSION

El cáncer de cérvix es uno de los tumores más frecuentes en la población femenina, ocupando una de las primeras causas de muerte en mujeres aunque existen grandes diferencias geográficas. A pesar de las importantes campañas de prevención y detección precoz, las cifras de incidencia y mortalidad son muy elevadas, sobre todo en países subdesarrollados, con poblaciones que no tienen acceso a programas de cribado.

Un problema importante del cáncer de cérvix es que, pacientes con tumores y características muy similares, evolucionan de forma completamente diferente, por lo que el objetivo de muchos estudios es encontrar puntos clave que marquen una diferencia, pudiendo así predecir cómo va a evolucionar la enfermedad y poder encontrar tratamientos personalizados para cada paciente.

En este estudio la supervivencia global a los 3 años fue del 79% y a los 5 años del 76,46%. Fue un porcentaje de supervivencia alto, a pesar de la elevada proporción de tumores en estadios avanzados (80/186 pacientes en estadios III y IV), y con un tamaño tumoral muy elevado (55,91% de las pacientes contaban con tumores mayores de 6 cm).

Unos buenos resultados comparados con lo que se puede encontrar en la literatura^{72,73}.

FACTORES PRONÓSTICOS CLASICOS

En el análisis univariante de este trabajo, todas las variables estudiadas a partir de factores clínico – patológicos (ECOG, FIGO, afectación ganglionar y tamaño tumoral), clásicamente aceptadas como factores pronósticos en el cáncer de cérvix, mostraron significación estadística para la supervivencia global, la progresión y el fracaso local.

Muchos estudios han tratado el tema de los factores pronósticos clínicos, habiendo discrepancias entre ellos^{74,75,76,77,78}.

En este estudio, la media de **edad** de las pacientes fue de 51 años, siendo el grupo más numeroso entre los 40 y los 60 años, representando el 53,76% de las pacientes estudiadas.

Estos resultados son congruentes con los datos disponibles de la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica), donde afirman que en España, la edad de las pacientes con carcinoma de cérvix se encuentra mayoritariamente entre los 40 y 55 años.

Al igual que en otros países desarrollados, las medidas tomadas para la prevención del cáncer cervical en mujeres jóvenes parecen obtener resultados, dándose casos de carcinoma cervical en edades más avanzadas.

Esto podría ser causado por una dificultad de acceso a las medidas de prevención en una pequeña parte de la población, o bien por la falta de seguimiento de la población una vez superada la edad fértil.

En poblaciones menos desarrolladas la media de edad es más baja, siendo más elevado el número de pacientes menores de 40 años.

El **tipo histológico** predominante es el carcinoma epidermoide, en este caso el 83,33 % del total de neoplasias, un 16,13% corresponde al adenocarcinoma y un 0,54% al carcinoma adenoescamoso. Porcentaje similar al de otros estudios.

Existen datos controvertidos sobre el valor pronóstico del adenocarcinoma frente al carcinoma escamoso. Algunos autores como Kleine et al⁷⁹ y Chen et al.⁸⁰ encontraron diferencias pronósticas, en especial en los casos con un estadio FIGO muy bajo. Hopkins et al.⁸¹ demostraron que el adenocarcinoma presentaba una menor tasa de SG, frente al carcinoma escamoso en todos los estadios.

Sin embargo, existen otros estudios donde no encontraron diferencias entre los distintos tipos de tumor, como Kilgore et al⁸² y Kantayoo et al⁸³.

En esta serie de 186 pacientes tampoco se ha encontrado ninguna relación entre los tipos tumorales y la supervivencia, la progresión de la enfermedad, ni el fracaso local.

El estadio, definido según los criterios de la FIGO (International Federation of Gynecologica l Obstetrics), es el factor pronóstico más importante tanto para la respuesta al tratamiento como para la supervivencia como se ha demostrado en múltiples estudios.

El grupo de pacientes que estudiaban Kim et al. presentaban carcinomas de cervix avanzado, con un 63% de los tumores con un tamaño mayor de 4 cm, y un 60% de las pacientes con ganglios positivos. En su trabajo obtuvieron que tanto el estadio FIGO, como el tamaño tumoral y la afectación de los ganglios linfáticos son factores estadísticamente significativos⁸⁵.

Pérez et al. estudiaron 1178 pacientes con carcinoma de cérvix uterino, encontraron, que el estado clínico y el tamaño tumoral son importantes factores pronósticos en la supervivencia global⁸⁶.

Según el estadio FIGO en el que se encuentre la paciente, la supervivencia a los 5 años tiene diferencias significativas: mayor del 95% en los pacientes en estadio IA, del 80% al 90% en estadio IB, 75% en estadio II y de menos del 50% en estadio III o IV.

En este estudio, la supervivencia global a los 5 años fue del 76.46%. Respecto a la estadificación la supervivencia fue del 75% para el estadio IB1, 74,75% para el IB2, 87,66% para el estadio IIB, 68,64% para el IIIB y un 54% para el estadio IVA.

En esta serie, el estadio FIGO tuvo significación estadística tanto para la supervivencia global ($p=0,00$), la progresión de la enfermedad ($p=0,00$), así como para el fracaso local ($p=0,00$). Existe una asociación significativa entre mayor estado FIGO y peor supervivencia, progresión de la enfermedad y fracaso local.

En el caso de la supervivencia global, el riesgo de fallecimiento a los 5 años en las pacientes distribuidas en grupos FIGO mayores de IIB , fue 2,55 veces mayor que en las pacientes incluidas en grupos de FIGO menores de IIB.

El riesgo de progresión de la enfermedad a los 5 años en las pacientes incluidas en grupos FIGO mayores de IIB, es 2,89 veces mayor que en las pacientes incluidas en grupos de FIGO menores de ese valor.

El riesgo de fracaso local a los 5 años en las pacientes distribuidas en grupos FIGO mayores de IIB, es 5,05 veces mayor que en las pacientes incluidas en grupos de FIGO menores de IIB.

El **tamaño del tumor** está fuertemente asociado con el pronóstico en pacientes tratadas con radiación. Son numerosos los estudios publicados que tratan de establecer una relación entre el tamaño y el pronóstico del paciente⁸⁷. El tamaño tumoral se ha encontrado como factor independiente de supervivencia incluso en análisis multivariante^{88,89}.

La importancia del tamaño tumoral en el pronóstico del cáncer cervical es tan destacada que motivó que en la revisión de la clasificación hecha por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en 1995, se subdividiera el estadio IB en función de dicha variable, tanto por la mayor incidencia de metástasis ganglionares y extrapélvicas como por la menor supervivencia^{90,91}.

En un estudio realizado por Narayan et al. se analizaron 179 pacientes con carcinoma cervical avanzado tratados con radioterapia donde se observó que el volumen tumoral estaba asociado de forma significativa con la supervivencia global ($P = 0.004$)⁹².

Pérez et al. estudiaron 1178 pacientes con carcinoma de cérvix uterino, encontraron que el estadio clínico y el tamaño tumoral eran importantes factores pronósticos en la supervivencia global⁹³. Lee et al. obtuvieron similares resultados, pero a diferencia de Pérez et al., solo seleccionaron pacientes con estado FIGO IIB. Además del tamaño tumoral sus resultados también confirmaron la influencia de la afectación ganglionar en la supervivencia global de las pacientes⁹⁴.

Parker et al., para la supervivencia global obtenían que el tamaño tumoral y la afectación ganglionar eran estadísticamente significativos⁹⁵.

Hirawaka et al. estudiaron 123 pacientes con estadios FIGO IB-IIB, y concluyen que un tamaño tumoral mayor de 5 cm y una edad de la paciente menor de 48 años presentaban significación en la predicción de recurrencia locoregional para estas pacientes⁹⁶.

En el estudio que presentamos, se distribuyó a las pacientes según el tamaño del tumor fuera mayor o menor de 6 cm, cuando en la literatura se hace una distribución con el valor de 4 cm. Esta división fue adoptada dado que esta población sufre tumores de cérvix avanzados, por lo que todos son de gran tamaño.

En esta serie, 104 de 186 pacientes presentan tamaños tumorales mayores de 6 cm (55,91%) y 82 de 186 (44,09%) menores de este valor.

Al igual que en la mayoría de los estudios, en este trabajo, el tamaño tumoral tuvo significación estadística, para la supervivencia global, la progresión y el fracaso local.

Para la supervivencia global, las pacientes con tumores mayores de 6 cm tenían un incremento del riesgo de fallecimiento 2,20 veces mayor que las pacientes con tumores menores de 6 cm.

Las pacientes con tumores mayores de 6 cm incrementaban 2,28 veces el riesgo de tener una progresión de su enfermedad que las pacientes cuyo tumor era menor de 6 cm.

Las pacientes con tumores mayores de 6 cm tenían un incremento de fracaso local 1,99 veces mayor que las pacientes con tumores menores de 6 cm.

El tamaño del tumor es uno de los factores predictivos más importantes para las pacientes tratadas solo con radioterapia y quimioterapia concomitante como ocurre este caso.

El estado de **afectación de los ganglios** linfáticos tiene gran importancia en la progresión de la enfermedad y en la supervivencia⁹⁷. El impacto en la supervivencia depende prioritariamente del número, la localización y la posibilidad de resección de los ganglios afectados.

En un metanálisis llevado a cabo por el Gynecologic Oncology Group(GOG)⁹⁷ se demostró que las pacientes con metástasis en ganglios paraaórticos tenían un mayor riesgo de recaída y mortalidad.

Diferentes trabajos lo demuestran como el de Lee et al. que presentaban un grupo de 75 pacientes con un estadio FIGO IIB, para la supervivencia global,

encontraron una significación estadística desfavorable para el tamaño tumoral mayor de 4,5 cm y para la afectación ganglionar⁸⁴.

Parker⁹⁵ et al. también obtuvieron una significación estadística en la supervivencia global para la afectación ganglionar.

En el estudio realizado por Uno et al., el estado de los ganglios pélvicos tuvo un impacto significativo en la supervivencia. La supervivencia global a los 5 años en pacientes con ganglios positivos y negativos fue de 52% y 89%, respectivamente ($P = 0.0005$)⁹⁸.

La serie de Kim et al. contaba con más pacientes con ganglios positivos que negativos, posiblemente porque sus pacientes tenían carcinomas de cérvix avanzados. En el presente estudio se dan las mismas características en el grupo de pacientes, el 53,76% tenían ganglios positivos. En ambos casos, se ha identificado la afectación ganglionar como factor pronóstico significativo para la supervivencia global.

Las metástasis paraaórticas conferían un pronóstico desfavorable con supervivencias cercanas al 40% a los 5 años.⁹⁹

En el presente trabajo se obtuvo que, las pacientes con ganglios paraaórticos positivos incrementaron el riesgo de fallecimiento en 2,10 veces con respecto a las pacientes con ganglios pélvicos positivos. Las pacientes con ganglios positivos tendrían 1,61 veces más riesgo de tener una progresión de su enfermedad comparada con las pacientes sin ganglios afectados.

Las pacientes con ganglios afectados tienen un riesgo de fracaso local 1,86 veces mayor que las pacientes sin ganglios afectados.

El **estado general** de las pacientes medido por la escala ECOG es un factor pronóstico no tenido en cuenta por muchos trabajos. En los trabajos de Hanks¹⁰⁰ y Stehman¹⁰⁰

Demostraron una asociación significativa entre el buen estado general, con ECOG menor de dos, y un mejor pronóstico.

En este estudio se obtuvo que el estado general del paciente tenía una significación estadística tanto para la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia libre de fracaso local.

La supervivencia a los cinco años para pacientes con un ECOG menor de dos fue del 81,30%, mientras que en las pacientes con ECOG mayor de dos la supervivencia descendió hasta el 51,94%. Las pacientes con valores elevados de ECOG tuvieron un riesgo de fallecimiento 3,46 veces mayor que las pacientes con valores de ECOG menores de dos, un riesgo de sufrir una progresión de su enfermedad 3,18 veces mayor, y un riesgo de fracaso local 3,65 veces mayor que las pacientes con mejor estado general.

FACTORES PRONOSTICOS MOLECULARES

Una limitación que hemos encontrado en el estudio del cáncer de cérvix en relación a la comparación de los diferentes trabajos que aparecen en la literatura es la variabilidad, en cuanto a la diversidad de los estadios analizados, los tratamientos aplicados, las proteínas estudiadas, y la valoración hecha por cada grupo de investigación sobre el valor de corte asignado a cada marcador.

En los factores pronósticos clínicos, la distribución de los grupos de pacientes está más definida, teniendo criterios determinados para su clasificación, pero en la expresión de las proteínas los estudios son más heterogéneos, siendo difícil sacar conclusiones.

El estado de la proliferación tumoral se ha convertido en un factor pronóstico en el cáncer cervical. Para evaluar la proliferación celular utilizamos la proteína nuclear **Ki67**. En diferentes tipos de tumores, el Ki67 se conoce como un factor predictivo, y su expresión generalmente es correlacionada con mal pronóstico, como ocurre en la mama, el carcinoma de pulmón de células no pequeñas o el carcinoma de ovario, aunque en el cáncer de cérvix aún se discute su papel.

Algunos estudios apoyan un peor pronóstico a medida que el valor de ki67 es mayor: Garzetti et al., 1995; Padovan et al., 2000; Ho et al., 2000; Liu et al., 2001).

Hanprasertpong et al. recopilaron 235 pacientes con carcinomas escamosos de cérvix en estadio I tratados con histerectomía radical. Estudiaron Ki67 como factor pronóstico y obtuvieron que las pacientes con un valor de Ki67 por encima del 30% tenían un significativo peor pronóstico¹⁰¹.

Durant et al. aseguran que las pacientes con un alto porcentaje de células tumorales proliferantes tenían una peor respuesta a la radioterapia¹⁰².

Y otros postulan que valores pequeños de Ki67 son los que tienen peor pronóstico.

Nakano et al. estudiaron 64 pacientes con carcinomas escamosos invasivos tratados solo con radioterapia. Situaban el punto de corte de la expresión de Ki67 en el 33% y obtuvieron que en la supervivencia a los 5 años, las pacientes con valores de Ki67 menores del 33 % tuvieron una supervivencia más baja que las pacientes con valores mayores del 33%. Concluyen que Ki67 podría ser considerado un efectivo factor pronóstico en la radioterapia para el cáncer cervical^{103,104,105}.

Suzuki et al. estudiaron 67 pacientes con carcinoma de cérvix en estado IIIB tratados con radioterapia y obtuvieron una mejor supervivencia en las pacientes con valores de Ki67 mayores del 26,4% frente a las de menor índice de Ki67. Concluyen que Ki67 podría predecir efectivamente la sensibilidad del cáncer de cérvix a la radioterapia¹⁰⁶.

En este trabajo, la proliferación, medida por la proteína Ki67, tiene un valor significativo tanto para la supervivencia global ($p=0,01$), supervivencia libre de la progresión ($p=0,06$) como la supervivencia libre de fracaso local ($p=0,008$). Pero no se correlaciona con ninguno de los factores clínicos estudiados.

Además, se pudo comprobar que en el análisis de regresión de Cox, comparando los grupos de pacientes con valores de ki67 mayores de 40%, con los menores de este valor, se encontró como resultado que, para las pacientes con valores de expresión de la proteína Ki67 menores del 40% de células tumorales marcadas se apreciaba una considerable disminución de la supervivencia global. Las pacientes con una expresión de Ki67 menor del 40% presentan un riesgo de

fallecimiento un 64% mayor que las pacientes con valores de Ki67 entre el 40 y 70 % de células tumorales marcadas, y un 71,33% mayor que las pacientes con valores de Ki67 por encima del 70%.

El riesgo de progresión fue un 58,2% y 61,2% mayor para las pacientes con valores de Ki67 menores del 40% que para las pacientes de los otros grupos respectivamente.

El riesgo de fracaso local para las pacientes con valores de proliferación bajos, fue aproximadamente un 75% y 71% mayor que para las pacientes de los otros grupos.

Se ha podido apreciar en estos datos, como, para la supervivencia global los mejores tasas de supervivencia fueron para las pacientes con tumores cuyo índice de proliferación estaba por encima del 70% de células tumorales marcadas, sin embargo no ocurre igual para la supervivencia libre de progresión, o para el fracaso local. Pero en cualquiera de las situaciones el peor pronóstico fue para las pacientes con expresión de Ki67 menor del cuarenta por ciento de células tumorales marcadas.

Según estos datos la proliferación representa un factor pronóstico independiente.

En este estudio las pacientes con valores de Ki67 menores del 40% tienen un peor pronóstico que las pacientes con valores superiores.

La discusión de las discrepancias en este sentido está basada en el tipo de tratamiento de las pacientes, quirúrgico o radioterápico.

En buena parte de los estudios donde la proteína Ki67 no se significa como factor pronóstico y los valores elevados de esta proteína confieren un peor pronóstico, presentan pacientes tratadas con cirugía.

Sin embargo, la radiación surte mejor efecto en las células que están en división activa o que se dividen rápidamente. No funciona tan bien en las células que se encuentran en la etapa de reposo (G0) o que se dividen lentamente por lo que en las pacientes tratadas con radioterapia, cabría pensar que en los tumores con unos

valores de proliferación bajos hay más células en fase G0 que proliferantes, por lo que al actuar peor la radioterapia se traduce en una persistencia de la enfermedad, lo que conlleva una supervivencia global menor así como a un mayor fracaso local y progresión de la enfermedad¹⁰⁷.

Otro factor que influye en la diversidad de resultados en el estudio de Ki67, o de cualquier otro factor, es la elección del punto de corte por el que consideramos positivo o negativo el valor de la expresión de esa proteína. Analizando los valores de corte para Ki67 en los trabajos utilizados para un metanálisis de Ki67 en cáncer de cérvix publicado en 2015¹⁰⁸, varían entre el 1% y el 52%. Algunos trabajos de investigación eligieron valores arbitrarios, otros eligieron el valor medio para definir los valores de expresión, que, a pesar de ser el más estandarizado para los factores pronósticos, podría causar cierta pérdida de información.

Spyratos et al., aunque trabajaban con cáncer de mama, hicieron un estudio muy completo sobre los niveles de corte para Ki67 apoyado en la medición de las células en fase S por citometría de flujo y la medición de la timidina quinasa. Hicieron 5 niveles de corte para Ki67 (10%, 15%, mediana 17%, 20% y 25%).

Después de diferentes pruebas establecen que, en los casos con poca proliferación el valor de corte debería ser del 10% y los de mayor proliferación del 25%. Pero añaden, la elección del punto de corte depende del siguiente objetivo clínico: Si el valor de Mib1 se utiliza para excluir pacientes con tumores de baja proliferación de protocolos quimioterapéuticos, el corte del 10% ayudara a evitar el sobretratamiento.

Pero, si se usa para incluir pacientes sensibles para un protocolo de quimioterapia es preferible fijar el límite de corte en el 25%. Aunque aconseja hacer también otros marcadores de proliferación alternativos que apoyen los datos¹⁰⁹.

Ha habido otros trabajos semejantes al de Spyrcos et al. estudiando el valor de corte en la expresión de Ki67 para otros tipos de tumores^{110,111}.

En el presente estudio, las pacientes tenían tumores de cérvix avanzados, la mayoría de gran tamaño y con un alto índice de proliferación. Se decidió dividir la valoración de la expresión de ki67 en tres tramos, menos del 40% de células tumorales marcadas, entre el 40% y el 70%, y más del 70% de células tumorales

marcadas. Verdaderamente en este trabajo el punto de corte estuvo en el 40% de células tumorales con expresión de ki67, ya que los otros dos grupos se comportaron de manera similar.

La determinación por IHQ de la densidad de microvasos mediante **CD34** es un método utilizado para evaluar la angiogénesis tumoral. En cáncer de cérvix, un aumento de la densidad de microvasos se correlaciona con una mayor incidencia de metástasis, un peor control local y peor pronóstico^{112,113,114,115}.

Randall et al¹¹⁵. concluyeron en su estudio que la densidad de microvasos es un factor pronóstico importante en estadíos precoces del cáncer cervical.

Ancuta et al¹¹⁶ and Lenczewski et al¹¹⁷ independientemente reportaron en sus estudios que una alta densidad de microvasos estaba asociada con unas peores cifras de supervivencia.

En este estudio evaluamos la densidad de microvasos en los tumores de las 186 pacientes con el marcador CD34. Se utilizó un valor de corte del 15 microvasos, considerándose una alta expresión de CD34 cuando su recuento era mayor de este valor.

En esta población el 36,02% tenía menos de 15 microvasos, y el 63,98% estaba por encima de ese valor.

En este estudio no se encuentra asociación entre ninguno de los factores clínicos estudiados y el número de microvasos marcados con CD34.

Tampoco se encuentra ninguna asociación entre el número de microvasos y las otras proteínas estudiadas, p53, p21waf y ki67.

No se encontraron diferencias significativas para la densidad de microvasos en relación con la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión, ni la supervivencia libre de fracaso local.

La proteína **p53** desempeña un papel importante en el control celular y la apoptosis. La pérdida de función de p53, en el caso de cérvix, principalmente por inactivación, llevada a cabo por el virus HPV, juega un papel importante en la carcinogénesis tumoral.

La sobreexpresión de p53 se asocia a un peor pronóstico en diversos tumores, como gástrico¹¹⁷ endometrio¹¹⁷ y mama¹¹⁷ sin embargo, en el carcinoma de cérvix su valor pronóstico es incierto.

Suzuki et al¹¹⁸ estudiaron 53 pacientes con diferentes estadios FIGO, y concluyeron que la expresión de p53 en pacientes tratadas con radioterapia se asociaba a una menor supervivencia libre de progresión.

Sin embargo en otros estudios como el de Hellberg et al¹¹⁹ y el de Ebara et al¹²⁰ con pacientes tratadas solo con radioterapia no encuentran valor pronóstico para p53¹²¹.

En esta serie de 186 pacientes se consideró alta expresión de la proteína p53, para valores superiores al 10%. Un 81,72% de la población tenía valores superiores al 10% de p53, y un 18,28% tenía valores por debajo de ese valor.

Los valores de la expresión de la proteína p53 en este estudio fueron muy elevados.

En este estudio no se encuentra asociación entre p53 y ninguno de los factores pronósticos clásicos, el FIGO, el tamaño tumoral, tipo histológico y afectación ganglionar. Sin embargo, los valores de p53 fueron elevados, un 81,72% de las pacientes tenían una expresión de p53 superior al 10% de las células tumorales.

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y supervivencia libre de fracaso local.

Sin embargo, cuando se estudia la relación de p53 con las otras proteínas, se encuentra que con la proteína p21waf hay una relación de dependencia ($p = 0,000$),

no encontrándose significación ni con el número de microvasos ni con la proliferación.

La proteína **p21waf** es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina. Su actuación es crucial en la evolución del ciclo celular, y su papel está ligado a la proteína p53, aunque también puede actuar de forma independiente.

La expresión de p21waf en otros tumores diferentes al carcinoma de cérvix, como ovario, colon, o estómago, está asociada con un pronóstico favorable. Sin embargo, la importancia pronóstica en carcinoma de cérvix varía según los diferentes estudios.

Skomedal et al. seleccionaron 74 casos de carcinoma de cérvix, y 10 leiomiomas que empleaban de control. Obtuvieron expresión de la proteína en el 96% de los tumores, mientras no encontraron expresión en su grupo de control.¹²³.

Otros autores observaron un aumento de la expresión de p21 en las lesiones a medida que iban malignizando, desde epitelio normal, lesión premaligna, carcinoma invasivo.

Bae et al. realizaron un estudio con muestras que mostraban diferentes tipos de lesiones y malignidades, obteniendo un aumento importante de la expresión de p21waf en carcinomas invasivos.¹²⁴

Sin embargo Huang et al. estudiaron la expresión de p21waf en lesiones precancerosas de cérvix, desde lesiones intraepiteliales de bajo grado hasta carcinoma invasivo. En su estudio obtuvieron que a medida que las lesiones iban malignizando, los valores de p21waf iban disminuyendo, desde el 50% en el tejido normal, hasta el 9,9 % en los carcinomas invasivos. Ellos lo justificaban diciendo que p21waf actuaría como supresor de tumor en el tejido neoplásico, por lo que su inactivación podría ser indicador de carcinogénesis cervical.¹²⁵

Van de Putte et al. estudiaron 221 pacientes con carcinoma cervical escamoso en estado IB, y aunque un 40% de ellos expresaban la proteína p21waf, no encontraron ninguna asociación con el pronóstico.¹²⁷

Cheung et al. obtuvieron una correlación entre la expresión de p21waf y dos factores, la enfermedad en estadio avanzado y HPV negativo.¹²⁸

En la mayoría de los estudios no hubo asociación significativa entre p21 y ninguno de los factores clínicos. Kim¹²⁹, Skomedal¹²³, Bae.¹²⁴

En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre la proteína p21waf y la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia libre de fracaso local.

Los valores de expresión de la proteína p21waf en esta población fueron elevados, el 81,72% de las pacientes tenían un valor de expresión de la proteína superior al 20% de las células tumorales.

Tampoco se encontraron diferencias significativas con los factores clínicos como el

estadío, el estado general del paciente, el tamaño tumoral o la afectación ganglionar. Pero, sí se encontró diferencia significativa ($p = 0,016$) con el tipo histológico. Los carcinomas epidermoides mostraron mayor expresión de p21waf que los adenocarcinomas. Tal vez esto fuera debido a la naturaleza epitelial de los carcinomas, ya que la proteína p21waf, además de participar en la regulación del ciclo celular, se encuentra implicada en la diferenciación de las células epiteliales.^{130,131,132}

También se investigó la **relación entre las proteínas estudiadas**.

Al realizar los estudios estadísticos para comprobar la existencia o no de relación entre las proteínas estudiadas cobró relevancia la relación entre la expresión de las proteínas p53 y p21waf. Se obtuvo un valor significativo del *p valor* de la chi cuadrado de Pearson, lo que indicaba una relación de dependencia entre ellas.

En base a estos resultados se investigó si esta asociación tenía influencia sobre la supervivencia global, pero no se encontró significación.

Por su papel en la regulación del ciclo celular, se planteó el estudio de la relación de p53 y p21waf con la proliferación celular. Los resultados indicaron una clara significación, cuando p53 y p21waf tenían valores bajos de expresión, por debajo de sus puntos de corte, existía una correlación significativa con el grupo de pacientes cuyo valor de Ki67 era mayor del 70%.

Según estos resultados y la cadena de acontecimientos que intervienen en el ciclo celular, podríamos pensar que en el carcinoma avanzado de cérvix, cuando las proteínas p53 y p21waf se encuentran en niveles muy bajos, no detendrían el ciclo celular para reparar los errores en el DNA, la proliferación como nos muestra Ki67 sería muy alta, la célula se dividiría activamente acumulando errores, facilitando así la formación de los tumores.

Serían necesarios estudios adicionales para validar estos resultados

Esta serie de pacientes es consistente, son 186 pacientes con tumores de cérvix avanzados por lo que sería una buena base para su ampliación con otros estudios.

CONCLUSIONES

- 1.1. No encontramos ninguna relación significativa entre la expresión de las proteínas p53, p21^{waf} y CD34 tanto con la supervivencia global, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia libre de fracaso local de las pacientes con carcinoma avanzado de cérvix tratadas solo con radioterapia y quimioterapia concomitante.
 - 1.2. La proliferación, medida por la expresión de la proteína Ki67 fue un factor con significación tanto en la supervivencia global, la progresión y el fracaso local.
 - 1.3. Los valores de Ki67 menores del 40% fueron un indicador de mal pronóstico en la supervivencia para las pacientes tratadas con radioterapia y quimioterapia concomitante.
 - 1.4. La proteína p21^{waf} se relacionaba significativamente con el carcinoma epidermoide, tal vez por el papel que desempeña esta proteína en la diferenciación de las células epiteliales.
-
- 2.1 Se encontró una relación significativa entre las proteínas p53 y p21^{waf}, aunque no tuvo ningún impacto en la supervivencia de las pacientes, tampoco en la progresión, ni en el fracaso local.
 - 2.2. Sin embargo, cuando la expresión de p53 y p21^{waf} era baja se correlaciono significativamente con una alta proliferación, medida por expresión de la proteína Ki67
Estos datos podrían ampliarse para mejorar el conocimiento de la actuación de estos factores en los tumores de cérvix de alto grado.
-
- 3.1 No se encontró asociación entre la expresión de las proteínas p53, CD34 y Ki67 con los factores clínicos estudiados.
 - 3.2 Se encontró una relación significativa entre la proteína p21^{waf} y el tipo tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11.
- 2.- Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Aldea M, Serrano B, Valencia S, Brotons M, Mena M, Cosano R, Muñoz J, Bosch FX, de Sanjosé S, Castellsagué X. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Spain. Summary Report 2014-12-18.
- 3.-Castellsague X, Munoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis—role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003(31):20-8.
- 4.-Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002 Mar 30;359(9312):1093-101.
- 5.-Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJL, Shah KV. The causal relation between human papilloma virus and cervical cancer. J Clin Pathol 2002;55:244-65.
- 6.-Bosch FX, Manos MM, Muñoz M, Sherman M, Jansen AM, Peto J.Prevalence of human papilloma virus in cervical cancer a worldwide perspective. Study Group. J Natl Cancer Inst. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) 1995; 87:796 802.
- 7.-Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J,Ferreira S, Santos M, Miyamura RA,et al. Persistent human papilloma virus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia.JAMA 2001; 286:3106-14.142
- 8.-Phillips AN, Smith GD. Cigarette smoking as a potential cause of cervical cancer: has confounding been controlled?. mt j Epidemiol 1.994; 23: 42-49.

- 9.-Hellberg D, Valentin J, Nilsson S. Smoking as risk factor in cervical neoplasia. *Lancet*. 1983 Dec 24-31;2(8365-66):1497.
- 10.-Hellberg D, Nilsson S, Haley NJ, Hoffman D, Wynder E. Smoking and cervical intraepithelial neoplasia: nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and nonsmokers. *Am J Obstet Gynecol*. 1988 Apr;158(4):910-3.
- 11.-Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Jun 18;89(12):868-73.
- 12.- Delgado M, Sillero M, Martín JM, Gálvez R. Oral contraceptives and cáncer of the cervix uteri. A meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1.992; 71: 368-376
- 13.-Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human Papillomavirus types in invasive cervical cancer: worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88:63-73.
- 14.-Hu X, Pang T, Asplund A, et al. Clonality analysis of synchronous lesions of cervical carcinoma based on X chromosome polymorphism, human papillomavirus type 16 genome mutations, and loss of heterozygosity. *J Exp Med* 2002;195:845-854.
- 15.-Reagan JW, Wentz WB. Genesis of carcinoma the uterine cervix. *Clin Obstet Gynecol* 1967; 10: 883.
- 16.-Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/ vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer - Verlag, 1994.
- 17.-Lacruz C. Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *Rev Esp Patol*.2003;36(1):5-10.

18.-Miller AB. Control of carcinoma of the cervix by exfoliative cytology screening. In : Coppleson M, ed. Gynecologic Oncology: fundamental principles and clinical practice. Edinburgh. Churchill Livingstone 1981; 381.

19.-Tavassoli FA, Devilee P (Eds): World Health Organization Classification of Tumours .Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003.

20.-Hardisson D. Carcinoma de cérvix. Tipos histológicos y factores pronósticos. En: X Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 2009.

21.-Tseng CJ, Pao CC, Tseng LH, et al. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the uterine cervix: association with Epstein-Barr virus and human papillomavirus. Cancer 1997;80:91-97

22.-Steeper TA, Piscioli F, Rosai J. Squamous cell carcinoma with sarcoma-like stroma of the female genital tract: clinicopathologic study of four cases. Cancer 1983;52:890-898

23.-Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, et al. Internacional trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. Int J Cancer 1998;75:536-545.

24.-Lacey JV Jr, Brinton LA, Abbas FM, et al. Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999;8:1079-1085.

25.-De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer principles and practice of oncology. 9th Ed. Lippincott – Raven 2011.

26.- SEGO: Sociedad Española Ginecología y Obstetricia [Internet]. Madrid: SEGO;2005. Cáncer de cérvix: diagnóstico y tratamiento. Disponible en: www.sego.es.

27.-Lerma E. Factores que intervienen en la diseminación del cáncer de cuello uterino. Rev Esp Patol.2005;38(4):201-206.

28.-Lanzón R, Ruiz MA, Lanzón A. Cáncer invasor del cuello uterino. En: Cabero L. Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción. Madrid:Médica Panamericana; 2003.p.1559-1577.

29.-Actualización de la estadificación de cáncer de cuello uterino.Claudia Álvarez (1), Ernesto Castro Nessim (2), Juan Martín Virginillo (1), Gabriel Bruno (1),Christian González (1), Javier Vallejos (1), Adriana Dieguez RAR - Volumen 76 - Número 2 – 2012 pag 169

30.-Cervix. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, editors. American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010. p. 463-476.

31.-Elledge ,Science. 1996 Dec 6;274(5293):1664-72. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis.lledge SJ1.

32.-Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterinecervix. Gynecol Oncol 2001;82:238-46.

33.- *Martín A, Odajima J, Hunt SL et al. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27Kip1 and p21Cip1. Cancer Cell. 2005; 7: 591-598.*

34.-Kim, Y. T. and Zhao, M. (2005). Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. Yonsei Medical Journal, vol 46, num 5, pp. 597-613.

35.-Kim, Y. T. and Zhao, M. (2005).Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. Yonsei Medical Journal, vol 46, num 5, pp. 597-613.

36.-. Verschuren, E. W.; Jones, N. and Evan, G (2004). The cell cycle and how it is steered by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin. Journal of General Virology, 85: 1347-1361.

- 37.-Burdon, T. Smith, A. and Savatier, P. (2002).Signalling, cell cycle and pluripotency inembryonic stem cells. Trends in Cell Biology, vol 12,num 9, pp. 432-438.
- 38.- Kim, Y. T. and Zhao, M. (2005). Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. Yonsei Medical Journal, vol 46, num 5, pp. 597-613
- .
39. - Ryan K. M, Phillips AC y Vousden KH (2001) Regulation and Function of the p53 tumor suppressor protein. Current Opinion in Cell Biology 13:332-337
- 40.-Kim, Y. T. and Zhao, M. (2005). Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. Yonsei Medical Journal, vol 46, num 5, pp. 597-613.
- 41.-Ryan K. M, Phillips AC y Vousden KH (2001) Regulation and Function of the p53 tumor suppressor protein. Current Opinion in Cell Biology 13:332-337
- 42.- Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. Virus Genes. 2010;40:1–13.
- 43.-Furumoto H, Irahara M. Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. J med Invest 2002; 49:124-133.
- 44.-Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol. 2001;82(2):238-246.
- 45.-Ashcroft M, Voudsen KH. Regulation of p53 stability. Oncogene 1999; 18(53): 7637-43.
- 46.-Morris, 2002Morris SM: a role for p53 in the frequency and mechanism of mutations. Mutat Res 2002;

- 47.-Munger K, Basile JR, Duensing S, 2001: Actividades biológicas y blancos moleculares de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano. *Oncogen*. 20: 7888-98.
- 48.-The Health's Professional's HPV HANDBOOK I: Human papillomavirus and cervical cancer 2004. The European Consortium for Cervical Cancer education. Taylor and Francis Group. pp18 -19.
- 49.- Lee JS, Kim HS, Park JT, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in the progression of cervical neoplasia and its relation to angiogenesis and p53 status. *Anal Quant Cytol Histol* 2003; 25:303-11.
- 50.-Rasila KK, Burger RA, Smith H, et al. Angiogenesis in gynecological oncology – mechanisms of tumor progression and therapeutic targets. *Int J Gynecol* 2005; 15:710- 726.
- 51.-Abulafia O, Sherer DM. Angiogenesis in the uterine cervix *Int J Gynecol Cancer*. 2000;10(5):349 357.
- 52.-Lenczewski A, Terlikowski SJ, Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Kulikowski M. Prognostic significance of CD34 expression in early cervical squamous cell carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol*. 2002;40(2):205-206.
- 53.-May & May, 1999 May P and May E: Twenty years of p53 research. Structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18(53):7621-36.
- 54.-Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; 60(24): 6788-93.
- 55.-Cuddihy AR, Bristol RG. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(3-4): 237-57.
- 56.-Levine et al., 1991 Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351(6326): 453-6

57.-Ashcroft & Voudsen,1999Ashcroft M, Voudsen KH. Regulation of p53 stability. Oncogene 1999; 18(53): 7637-43.

58.-Madhumati Goel.Kavita Somani.Anju Mehrotra...The J.of of Gynecology and Obstetrics of India October 2012,62(5)557-561

59.-Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol 2001;82:238-46.

60.-Milde-Langosch K, Riethdorf S. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. J Cell Physiol 2003;196:224-44.

61.-Funk JO. Cancer cell cycle control. Anticancer Res 1999; 19:4772-80.

62.- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent,J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993).WAF1, apotential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75, 817–825

63.-Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D.(1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366, 701–704.

64.-Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependentkinases. Cell 75, 805–816.

65.- El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, *et al.* WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res 1994;54:1169-74.

66.-Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. Cancer Res 1994;54:3391-5

67.-Decesse JT, Medjkane S, Datto MB, et al. RB regulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene* 2001;20:962-71.

68.-Michieli P, Chedid M, Lin D, et al. Induction of WAF1/CIP1 by ap53-independent pathway. *Cancer Res* 1994;54:3391-5.

69.-Brennan PA, Palacios-Callender M, Umar T, Tant S, Langdon JD. Expression of type 2 nitric oxide synthase and p21 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31:200-205

70.- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. *Int J Cancer.* 1983 Jan 15;31(1):13-20. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.

71.-Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H. Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol.* 1984 Oct-Dec;2(4):365-71.

72.- Lloret M., Pinar B., Clavo B., Ruiz A., González G., Hernández M. A., Lubrano A., Lara P. C., Falcón O.—Carcinoma epidermoide de cérvix tratado con radioterapia radical: factores clásicos de pronóstico y resultados. *Prog Obstet Ginecol* 2000;43:465-472.

73.-Tratamiento radical del cáncer de cérvix uterino con radioterapia: influencia de los factores pronósticos, resultados y *Rev Oncol* 2002;4(2):85-93.

74.-Kaap DS, Fisher D, Gutiérrez E, et al. Pretreatment prognostic factors in carcinoma of the uterine cervix: a multivariate analysis of the effects of age, stage, histology and blood counts in survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 9 (1983), pp. 445-55.

75.-Fyles AW, Pintilie M, Kirkbride P, et al. Prognostic factors in patients with cervix cancer treated by radiation therapy: results of a multiple regression analysis. *Radiother Oncol*, 35 (1985), pp. 107-17.

76. Toita T, Nakano M, Higashi M, et al. Prognostic value of cervical size and pelvic lymph node status assessed by computed tomography for patients with uterine cervical cancer treated by radical radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 33 (1985), pp. 843-9

77.- Tratamiento radical del cáncer de cérvix uterino con radioterapia: influencia de los factores pronósticos, resultados y complicaciones Cristina Gutiérrez , Ferrán Guedea Edo et al. *Rev Oncol* 2002;4(2):85-93.

78. Perez C. et al Effect of Tumor Size on the Prognosis of Carcinoma of the Uterine Cervix Treated With Irradiation.

79.-Kleine W, Rau K, Schwoeorer D, et al. Prognosis of the adenocarcinoma of the cervix uteri: a comparative study. *Gynecol Oncol* 1989; 35:35:145-9.

80.-Chen RJ, Lin YH, Chen CA, et al. Influence of histologic type and age on survival rates for invasive cervical carcinoma in Taiwan. *Gynecol Oncol* 1999; 73:184-90.

81.-Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1991; 77:912-7.

82.- Kilgore LC, Soong SJ, Gore H, et al. Analysis of prognostic features in adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1988; 31:137-48., Lee et al. Lee KBM, Lee JM, Park CY, et al. What is the difference between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix? A match case control study. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:1959-73.

83.-Kantayoo K, Sanguanrungrasirikul S, Manusirivithaya S. Comparison of treatment outcomes between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in locally advanced cervical cancer *Gynecologic Oncology* 2012;125:292-296.

84.-Lee DW, Kim YT, Kim JH, et al. Clinical significance of tumor volume and lymph node involvement assessed by MRI in stage IIB cervical cancer treated with chemoradiation therapy. *J Gynecol Oncol* 2010; 21:18-23.

85.-Kim TE, Park BJ, Kwack HS, et al. Outcomes and prognostic factors of cervical cancer after concurrent chemoradiation. *J Obstet Gynaecol Res* 2012; 38 (11): 1315-1320.

86.-Pérez CA, Grigsby PW, Nene SM, et al. Effect of tumor size on the prognostic of carcinoma of the uterine cervix treated with irradiation alone. *Cancer* 1992;69: 2796-2806.

87.-Dubben HH, Thames HD, Beck-Bornholdt HP. Tumor volume: a basic and specific response predictor in radiotherapy. *Radiother Oncol* 1998;47(2):167-74.

88.-Landoni F, Bocciolone L, Perego P. Cancer of the cervix, FIGO stages IB and IIA: patterns of local growth and paracervical extension. *Int J Gynecol Cancer* 1995; 5(5):329-34.

89.- Ogino I, Okamoto N, Andoh K, Kitamura T, Okajima H, Matsubara S. Analysis of prognostic factors in stage IIB. IVA cervical carcinoma treated with radiation therapy: value of computed tomography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37(5):1071-7.

90.-Rotman M, John M, Boyce J. Prognostic factors in cervical carcinoma: implications in staging and management. *Cancer* 1981;48(2): 560-7.

91.-Álvarez RD, Soong SJ, Kinney WK. Identification of prognostic factors and risk groups in patients found to have nodal metastasis at the time of radical hysterectomy for early stage squamous carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1989;35(2): 130-5.

92.-Narayan K, Fisher R, Bernshaw D. Significance of tumor volume and corpus uteri invasion in cervical cancer patients treated by radiotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16(2):623.

93.-Pérez CA, Grigsby PW, Nene SM, et al. Effect of tumor size on the prognosis of carcinoma of the uterine cervix treated with irradiation alone. *Cancer* 1992;69:2796-2806.

94.-Lee DW, Kim YT, Kim JH, et al. Clinical significance of tumor volume and lymph node involvement assessed by MRI in stage IIB cervical cancer treated with chemoradiation therapy. *J Gynecol Oncol* 2010; 21:18-23.

95.-Parker K, Gallop-Evans E, Hanna L, et al. Five years' experience treating locally advanced cervical cancer with concurrent chemoradiotherapy and high dose rate brachytherapy: results from a single institution. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;74:140-146.

96.-Hirawaka M, Nagai Y, Toita T, et al. High-risk Group for Locoregional Recurrence in Patients with Stage IB-IIB squamous cell carcinoma of the cervix treated with concurrent chemoradiotherapy. *Anticancer Research* 2011;31:1437-1442.

97.-Frederick B, Stehman MD, Brian N. Bundy PhD, Philip J. Disaia MD, Henry M. Keys MD, James E. Larson MD, Wesley C. Fowler MD. Carcinoma of the cervix treated with radiation therapy I. A multi-variate analysis of prognostic variables in the gynecologic oncology group (GOG). *Cancer* Volume 67, Issue 11 Cancer 1 June 1991 Pages 2776-2785

98.-Uno T, Ito H, Isobe K, Kaneyasu Y, Tanaka N, Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, Shigematsu N, Itami J. Postoperative pelvic radiotherapy for cervical cancer patients with positive parametrial invasion. *Gynecol Oncol* 2005;96(2):335-40.

99.-Odunski KO, Lele S, Ghamande S, Seago P, Driscoll DL. The impact of pre-therapy extraperitoneal surgical staging on the evaluation and treatment of patients with locally advanced cervical cancer.Eur J Gynaecol Oncol 2001;22(5):325-30.

100.-Hanks GE, Herring DF, Kramer S. Patterns of care outcome studies: Results of the national practice in cancer of the cervix.Cancer 1983; 51:959-967.

101.-Correlation of p53 and Ki-67 (MIB-1) expressions with clinicopathological features and prognosis of early stage cervical squamous cell carcinomasjog_1227 572..580 Jitti Hanprasertpong, Kobkul Tungsinmunkong, Saibua Chichareon, Virach Wootipoom, Alan Geater, Rakchai Buhachat and Sathana Boonyapipat J. Obstet. Gynaecol. Res. Vol. 36, No. 3: 572–580, June 2010.

102.-Durand et al., 2004Durand RE, Aquino-Parsons C. Predicting response to treatment in human cancers of the uterinecervix: sequential biopsies during external beam radiotherapy.Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004; 58(2):555-60.

103.-Nakano Takashi M.D,Oka Differential values of ki-67 index and mitotic index of proliferating cell population. An assessment of cell cycle and prognosis in radiation therapy for cervical cancer M.D. Cancer. 1993 Oct 15;72(8):2401-8.

104.- Nakano T1, Oka K, Ishikawa A, Morita S. Cancer Detect Prev. 1998;22(2):120-8.Immunohistochemical prediction of radiation response and local control in radiation therapy for cervical cancer.

105.-Nakano Takashi ,Kuniyuki Oka, Atsuko Ishikawa ,Shinroku Morita. Correlation of cervical carcinoma c-erb B-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma CANCER February 1, 1997 / Volume 79 / Number 3

- 106.-Suzuki M1, Tsukagoshi S, Saga Y, Ohwada M, Sato I. Gynecol Oncol. 2000 Nov;79(2):300-4.Assessment of proliferation index with MIB-1 as a prognostic factor in radiation therapy for cervical cancer.
- 107.- Nakano et al. Current advancement in radiation therapy for uterine cervical cáncer.Takashi Nakano, Tatsuya Ohno, Hitoshi Ishikawa, Yoshiyuki Suzuki and Takeo Takahashi. J.Radiat. Res.,51, 1-8 (2010)
- 108.-Denghua Pan, Kanglai Wei, Yanxin Ling, Shitao Su,Meilin Zhu, and Gang Chen,. The Prognostic Role of Ki-67/MIB-1 in Cervical Cancer: A Systematic Review with Meta-Analysis Med Sci Monit. 2015; 21: 882–889
- 109.-Spyratos F, Ferrero-Pous M, Trassard M, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. Cancer. 2002;94(8):2151–59.
- 110.-Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using “optimal” cutpoints in the evaluation of prognostic factors. J Natl Cancer Inst. 1994;86(11):829–35.
- 111.-Walts AE, Ines D, Marchevsky AM. Limited role of Ki-67 proliferative index in predicting overall short-term survival in patients with typical and atypical pulmonary carcinoid tumors. Mod Pathol. 2012;25(9):1258–64.
- 112.-Dellas A, Moch H, Schultheiss E, et al. Angiogenesis in cervical neoplasia: Microvessel quatitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations.Gynecol Oncol 1997; 67:27-33.
- 113.- Tjalma W, Van Marck E, Weyler J. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer.Br J Cancer 1998; 78:170-4.
- 114.- Obermair A, Wanner C, Bilgi S, et al. Tumour angiogenesis in stage IB cervical cancer : correlation of microvessel density with survival. Am J Obstet Gynecol 1998; 178:314-9.

115.-West CM, Cooper Ra, Loncaster JA, et al. Tumor vascularity: A histological measure of angiogenesis and hypoxia. *Cancer Res* 2001; 61: 2907-2910.

116.-Ancuta C, Ancuta E, Zugun-Eloae F, Carasevici E. Neoangiogenesis in cervical cancer: Focus on CD34 assessment. *Rom J Morphol Embryol*. 2010;51:289–94.

117.-Lenczewski A, Terlikowski SJ, Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Kulikowski M. Prognostic significance of CD34 expression in early cervical squamous cell carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol*. 2002;40:205–6.

118.-Suzuki Y, Nakano T, Kato S, et al. Immunohistochemical study of cell cycle associated proteins in adenocarcinoma of the uterine cervix treated with radiotherapy alone: p53 status has a strong impact on prognosis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2004; 60: 231-6.

119.-Hellberg D, Tot T, Stendahl U, et al. Pitfalls in immunohistochemical validation oftumor marker expression – exemplified in invasive cancer of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology* 2009; 112:235-40.

120.-Ebara T, Mitsuhashi N, Saito Y, et al. Prognostic significance of immunohistochemically detected p53 protein expression in stage IIIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation therapy alone. *Gynecol Oncol* 1996;63:216-218.

121.-Yamashita H, Murakami N, Asari T, et al. Correlation among six biologic factors (p53, p21 (WAF1), MIB-1, EGFR, HER2, and Bcl-2) and clinical outcomes after curative chemoradiation therapy in squamous cell cervical cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2009; 74:1165-72.

122.- (Differential Expression of p53 and p21 in Low Grade Cervical Squamous Intraepithelial Lesions Infected with Low, Intermediate, and High Risk Human

Papillomaviruses Athina Giannoudis, M.Sc.C. Simon Herrington, M.,CANCER
September 15, 2000 / Volume 89 / Number 6 .

123.-Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, CDK4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999;73:223-8.

124.-Bae DS, Cho SB, Kim YJ, Whang JD, Song SY, Park CS, et al. Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. *Gynecol Oncol* 2001;81:341-7.

125.-Huang LW, Chou YY, Chao SL, Chen TJ, Lee TT. p53 and p21 expression in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix: overexpression of p53 predicts poor disease outcome. *Gynecol Oncol* 2001;83:348-54.

127.-Van de Putte G, Holm R, Lie AK, Trope CG, KristensenGB. Corrigendum to "Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis". *Gynecol Oncol* 2004;92:730.

128.-Cancer Lett. 2001 Oct 22;172(1):93-8. Aberrant expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1) in cervical carcinoma. Cheung TH1, Lo KW, Yu MM, Yim SF, Poon CS, Chung TK, Wong YF.

129.-Kim et al.1998 Underexpression of Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors in Cervical Carcinoma Young Tae Kim, Nam Hoon Cho, Sang Won Park, Jae Wook Kim,*Gynecologic oncology* October 1998Volume 71, Issue 1, Pages 38–45.

130.-Perez CA, Brady LW. Principles and practice of radiation oncology. 3rd Ed. Lippincott – Raven. 1998.

131.-Milde-Langosch K, Riethdorf S. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. J Cell Physiol 2003;196:224-44.

134.-Funk JO. Cancer cell cycle control. Anticancer Res 1999;19:4772-80.

135.-Golias, C. H; Charalabopoulos, A. and Charalabopoulos, K (2004). Cell Proliferation and Cell Cycle Control: a mini review. Int J Clin Pract,58, 12:1134-1141.

136.- Stehman FB, Bundy BN, DiSaisa PJ, et al. Carcinoma of the cervix treated with radiation therapy.A multi – variate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. Cancer 1991; 67(11):2776-85.